

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología



**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FÍSICA Y
FUNCIONAL DE LA PROTEÍN FOSFATASA DUAL
MSG5 CON MAP QUINASAS EN
“SACCHAROMYCES CEREVISIAE”.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María José Marín Cuenda

Bajo la dirección de los doctores

María Molina Martín
Humberto Martín Brieva

Madrid, 2009

- **ISBN: 978-84-692-8579-4**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FÍSICA Y FUNCIONAL DE LA
PROTEÍN FOSFATASA DUAL MSG5 CON MAP QUINASAS EN
*Saccharomyces cerevisiae***

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

Dña. MARÍA JOSÉ MARÍN CUENDA

Directores:

MARÍA MOLINA MARTÍN

HUMBERTO MARTÍN BRIEVA

D^a. MARÍA MOLINA MARTÍN, Directora del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA: Que Dña. **MARÍA JOSÉ MARÍN CUENDA** ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de los doctores **MARÍA MOLINA y HUMBERTO MARTÍN**, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

**“ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN FÍSICA Y FUNCIONAL DE LA PROTEÍN
FOSFATASA DUAL MSG5 CON MAP QUINASAS EN *Saccharomyces cerevisiae*”**

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, 2009.

Fdo. Prof. Dra. D^a. María Molina Martín

Esta tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

- Una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia durante el período 2005-2009.
- El proyecto de investigación “La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio de proteínas bacterianas y humanas que interfieren con rutas de transducción de señales y están implicadas en diferentes patologías”. BIO2004-02019 subvencionado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT).
- El proyecto de investigación “Análisis global de la regulación de rutas de MAPKs y caracterización de proteínas de virulencia de *Salmonella* y *Burkholderia* en el modelo eucariótico de señalización *Saccharomyces cerevisiae*”. BIO2007-67299 subvencionado por el Ministerio De Educación y Ciencia (MEC).
- El proyecto de investigación “Desarrollo y Reprogramación de Sistemas Microbianos”. S-SAL-0246-2006 subvencionado por la Comunidad Autónoma de Madrid.

Índice

ÍNDICE.....	I
ABREVIATURAS.....	II
INTRODUCCIÓN.....	III
1. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKS	3
2. RUTAS DE MAPKS EN MAMÍFEROS	4
3. RUTAS DE MAPKS EN LEVADURAS	7
3.1. RUTA DE APAREAMIENTO	7
3.1.1 Respuesta transcripcional regulada por la ruta de apareamiento	10
3.2. RUTA DE CRECIMIENTO INVASIVO/PSEUDOFILAMENTOSO.....	11
3.2.1 Respuesta transcripcional regulada por la ruta de crecimiento invasivo/pseudofilamentoso	14
3.3. RUTA DE RESPUESTA A ALTA OSMOLARIDAD	15
3.3.1 Respuesta transcripcional regulada por la ruta de respuesta a alta osmolaridad	17
3.4. RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR	18
3.4.1 Respuesta transcripcional regulada por la ruta de integridad celular.....	22
3.5. RUTA DE ESPORULACIÓN	24
4. REGULACIÓN NEGATIVA DE LAS RUTAS DE MAPKS POR PROTEÍN FOSFATASAS	26
5. PROTEÍN FOSFATASAS DE MAPKS EN MAMÍFEROS	26
5.1. FOSFATASAS DE SERINAS/TREONINAS.....	26
5.2. FOSFATASAS DE TIROSINAS (PTPs)	28
5.2.1. Visión general de PTPs clásicas.....	28
5.2.2. PTPs que regulan MAPKs.....	29
5.2.3. Mecanismos de reconocimiento de sustrato y regulación catalítica	29
5.3. FOSFATASAS DE ESPECIFICIDAD DUAL (MKPs)	30
5.3.1. Visión general de las fosfatasa de especificidad dual (MKPs)	30
5.3.2. Clasificación	32
5.3.3. Mecanismos de reconocimiento de sustrato y activación catalítica	33
6. PROTEÍN FOSFATASAS DE MAPKS EN LEVADURAS	34
6.1. PROTEÍN FOSFATASAS DE SERINAS/TREONINAS.....	34
6.2. PROTEÍN FOSFATASAS DE TIROSINAS	35
6.2.1. Actividad PTP sobre la MAPK Hog1	35
6.2.2. Actividad PTP sobre la MAPK Fus3.....	36
6.2.3. Actividad PTP sobre la MAPK Sit2.....	36
6.3. FOSFATASAS DE ESPECIFICIDAD DUAL	37

6.3.1. Sdp1	37
6.3.2. Msg5	38
7. INTERACCIONES MEDIADAS POR DOMINIOS DOCKING	42
7.1. SITIOS DE ANCLAJE EN LAS MAPKS	42
7.2. DOMINIOS DE UNIÓN EN LOS SUSTRATOS Y REGULADORES DE LAS MAPKS	43
7.2.1. Dominios de unión en MAPKKs	44
7.2.2. Dominios de unión en proteínas fosfatasa	46
7.2.3. Dominios de unión en otras proteínas que interactúan con MAPKs	48
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	IV
MATERIALES Y MÉTODOS.....	V
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO	57
1.1. CEPAS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO	57
1.2. CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO	58
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	58
2.1. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA <i>S. CEREVISIAE</i>	58
2.2. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA <i>E. COLI</i>	58
3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	59
3.1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	59
3.2. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	59
4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	59
4.1. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO	60
4.2. PLÁSMIDOS PREVIAMENTE CONSTRUIDOS Y UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO	60
4.3. PLÁSMIDOS GENERADOS EN ESTE TRABAJO	62
5. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONALES	63
5.1. <i>MICROARRAYS</i> DE DNA	63
5.1.1. Extracción de RNA	63
5.1.2. Síntesis, marcaje e hibridación de arrays de cDNA.....	63
5.1.3. Análisis de imágenes de <i>microarrays</i>	64
5.1.4. Procesamiento de datos y métodos estadísticos	64
5.1.5. Visualización de resultados y clustering	65
5.2. RT-PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	66
6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN-BLOTTING	66
6.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS (SDS-PAGE).....	66
6.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.....	67

6.3. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA	67
6.4. INMUNODETECCIÓN (<i>WESTERN-BLOTTING</i>).....	68
7. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GST Y GST-MSG5 EN <i>E. COLI</i>.....	69
8. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN A MYC EN <i>S. CEREVISIAE</i>.....	69
9. ENSAYO QUINASA <i>IN VITRO</i>	70
10. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS <i>IN VIVO</i>: SISTEMA DE DOS HÍBRIDOS	71
10.1. SISTEMA DE DOS HÍBRIDOS EN CÉLULAS HAPLOIDES BASADO EN PGBT9 Y PGAD424	71
10.1.1. Valoración cualitativa de la interacción.....	71
10.1.2. Valoración cuantitativa de actividad β -galactosidasa	71
10.2. SISTEMA DE DOS HÍBRIDOS EN CÉLULAS DIPLOIDES BASADO EN PGBKT7 Y PGADT7	72
10.2.1. Valoración cualitativa de la interacción.....	72
10.2.2. Valoración cuantitativa de actividad β -galactosidasa	73
11. MICROSCOPIA.....	73
RESULTADOS.....	VI
1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE <i>S. CEREVISIAE</i> EN AUSENCIA DE MSG5	77
1.1. EL ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO GLOBAL EN MUTANTES <i>MSG5Δ</i> MEDIANTE MICROARRAYS DE DNA MUESTRA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES REGULADOS POR LA RUTA DE APAREAMIENTO Y DE INTEGRIDAD CELULAR	77
1.2. CONFIRMACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DEL MUTANTE <i>MSG5Δ</i> MEDIANTE ENSAYOS DE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	82
1.3. EN AUSENCIA DE MSG5, LA FOSFORILACIÓN DE SLT2 AUMENTA PERO NO LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN RLM1	82
1.4. EN UN MUTANTE <i>MSG5Δ</i> , RLM1 NO ES EL ÚNICO SUSTRATO FRENTE AL CUAL SLT2 PRESENTA UNA ACTIVIDAD REDUCIDA	86
1.5. EN MUTANTES <i>MSG5Δ</i> EN CONDICIONES BASALES, SLT2 TIENE SU ACTIVIDAD QUINASA REDUCIDA EN ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	87
1.6. EN PRESENCIA DE CAFÉINA, LA FOSFORILACIÓN DE SLT2 NO CONDUCE A LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN RLM1, PERO SÍ DE OTROS SUSTRATOS DE LA MAPK	88
1.7. POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS EN LA FALTA DE ACTIVACIÓN DE RLM1 EN MUTANTES <i>MSG5Δ</i>	90
1.7.1. Fus3 no regula negativamente la activación de Rlm1 por Slt2.....	91
1.7.2. Las chaperonas Hsp90 y Cdc37 no están implicadas en la falta de activación de Rlm1 en mutantes <i>msg5Δ</i>	92
2. ESTUDIO DE LA POSIBLE REGULACIÓN DE LA MAPK KSS1 POR MSG5	94
2.1. EN AUSENCIA DE MSG5 EXISTEN SIMILARES NIVELES DE FOSFO-KSS1 QUE LOS OBSERVADOS EN LA CEPA SILVESTRE A 24°C	94

2.2. MSG5 NO REGULA EL NIVEL DE FOSFORILACIÓN DE KSS1 EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN DE ESTA MAPK.....	95
3. ESTUDIO DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DE MSG5	99
3.1. MSG5 ^L PRESENTA MAYOR AFINIDAD QUE MSG5 ^S POR LAS MAPKS FUS3 Y KSS1	99
3.2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS ISOFORMAS DE MSG5 SOBRE LA MAPK FUS3 EN RESPUESTA A FEROMONA.....	101
3.2.1. Msg5 ^L es más efectiva que Msg5 ^S en la defosforilación de Fus3 en presencia de feromona	101
3.2.2. La transcripción de los genes FIG1 y ASG7 es mayor en presencia de Msg5 ^S que de Msg5 ^L	103
3.2.3. Tras estimulación con feromona, Msg5 ^S induce la formación de shmoos de mayor tamaño y en mayor porcentaje que Msg5 ^L	105
4. ANÁLISIS DE LAS REGIONES IMPLICADAS EN LA INTERACCIÓN DE MSG5 CON LAS DIFERENTES MAPKS.....	107
4.1. EL EXTREMO N-TERMINAL REGULADORIO DE MSG5 INTERACCIONA CON LAS MAPKS FUS3, KSS1 Y SLT2.....	108
4.2. MSG5 INTERACCIONA CON FUS3 Y KSS1 UTILIZANDO UNA REGIÓN DISTINTA A LA UTILIZADA CON SLT2.....	110
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS DE UNIÓN (DOMINIOS <i>D</i>) DE MSG5 A LAS MAPKS FUS3, KSS1 Y SLT2.....	112
4.3.1. Identificación de la secuencia aminoacídica de dos dominios de unión a MAPKS (dominios <i>D</i>) de Msg5	112
4.3.2. Kss1 y Fus3 interaccionan con Msg5 a través del primer dominio docking (MD1) identificado en esta fosfatasa.....	114
4.3.3. La integridad del CD en Fus3 y Kss1 es esencial para la interacción con Msg5, mientras que en Slt2 es prescindible.....	117
4.4. ESTUDIO DE LA REPERCUSIÓN FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN DE LOS DOMINIOS DE INTERACCIÓN IDENTIFICADOS.....	120
4.4.1. La mutación del primer dominio <i>D</i> de Msg5 reduce su acción sobre la MAPK Fus3 tras inducción por feromona y no afecta a la fosforilación de Slt2 en presencia de rojo Congo.....	120
4.4.2. La mutación de los dominios <i>D</i> de Msg5 no afecta a su fosforilación por Slt2 en condiciones de activación de la ruta de integridad celular.	122
DISCUSIÓN.....	VII
1. SLT2 PRESENTA UNA ESCASA ACTIVIDAD CATALÍTICA EN AUSENCIA DE MSG5.....	127
2. ACTIVIDAD DE MSG5 SOBRE KSS1	131
3. ESTUDIO DE LOS DOMINIOS IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN DE MSG5 CON LAS MAPKS.....	132
CONCLUSIONES.....	VIII

Abreviaturas

α	alfa
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
CFW	Blanco de Calcoflúor
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DSP	<i>Dual specificity phosphatase</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
EGTA	Ácido etilenbis (oxietilen nitrilo) tetra acético
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosín difosfato
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GMP	Guanosín monofosfato
GST	Glutation S-transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
HEPES	Ácido N-2-hidroxiletilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactósido
KIM	<i>Kinase Interaction Motive</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MKP	<i>MAP kinase phosphatase</i>
MOPS	Ácido 3-N-morfolino propanosulfónico
ONPG	Orto-nitro fenil- β -D galactopiranósido
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonato
pNPP	Para-nitro fenil fosfato
PPs	<i>Serin protein phosphatases</i>
PTP	<i>Protein tyrosin phosphatases</i>
RC	rojo Congo
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SGD	<i>Saccharomyces genome database</i>
UV	Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-d-galactopiranósido
YPD	<i>Yeast extract-peptone-dextrose</i>

Introducción

1. RUTAS de TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKS

Las células eucarióticas son capaces de detectar cambios en el medio externo y responder adecuadamente con el fin de sobrevivir. Entre los mecanismos moleculares empleados para hacer frente a estas variaciones destacan las rutas de transducción de señales que incluyen, entre otras, las rutas mediadas por MAP (*Mitogen Activated Protein*) quinasas, muy conservadas en la evolución, y que regulan diferentes procesos celulares, desde la proliferación y diferenciación celular, a la apoptosis (Qi & Elion, 2005).

Estas rutas se caracterizan por estar compuestas por un módulo básico de tres quinasas cuya activación se produce tras un proceso de fosforilación secuencial (**figura 1**). Así la MAPKKK fosforila a la MAPKK y ésta a su vez fosforila y por tanto activa a la MAPK. Es necesaria la activación de esta última enzima para generar una respuesta adaptativa a las modificaciones originadas en el entorno extracelular. Una gran variedad de estímulos, que incluyen la unión de ligandos a sus receptores celulares en las membranas biológicas, y distintas situaciones de estrés celular inducirán en último término, la activación de estas MAPKs (Widmann *et al.*, 1999).

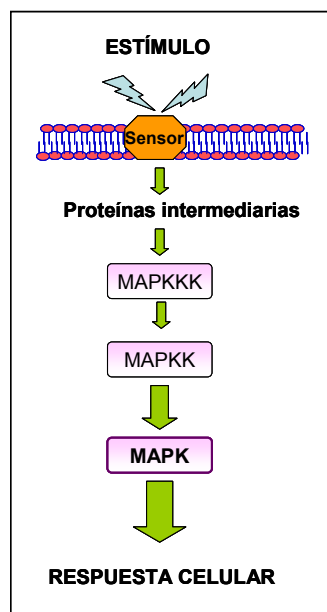


Figura 1. Esquema del módulo de activación en cascada de las rutas de MAPKs

De esta forma, los receptores celulares captan la señal procedente del exterior, que es transmitida al módulo de MAPKs a través de componentes intermediarios, generalmente proteínas de tipo GTPasa, también denominadas proteínas G, o proteínas quinasas. Las proteínas G poseen dos conformaciones: cuando están unidas a GTP, están activas y por tanto son capaces de transmitir la señal; pero además estas proteínas tienen actividad GTPásica, de manera que el paso de GTP a GDP las convierte en inactivas. Ambos procesos se pueden ver facilitados por la actuación de otras proteínas reguladoras: las GEFs (*guanine-nucleotide-exchange-factors*), que promueven el intercambio de GDP por GTP, estabilizando la forma unida

a este último y activan, por tanto, a la GTPasa; y las GAPs (*GTPase-activating proteins*), que estimulan la actividad GTPásica intrínseca de la proteína, favoreciendo la unión a GDP y por tanto la forma inactiva. A su vez las proteínas G pueden ser heterotriméricas, formadas por tres subunidades α , β y γ , o monoméricas, pertenecientes a la superfamilia Ras, que incluye diferentes subfamilias.

Generalmente, estas GTPasas actúan sobre protein kinasas de dos tipos, proteínas que forman parte de la familia PAK (*p21-activated-kinase*) cuya actividad quinasa es estimulada tras la unión con la GTPasa, y proteínas pertenecientes a la familia PKC (proteín quinasa C) también con actividad serín-treonín quinasa. Una vez activadas, son capaces de fosforilar el primer componente del módulo básico de MAPKs, la MAPKKK.

Tras la activación de la MAPKKK, ésta fosforila residuos de serina o treonina conservados en el dominio de activación de la MAPKK. Esta quinasa de especificidad dual activada fosforila a su vez dos aminoácidos específicos y conservados, treonina y tirosina, presentes en el dominio de activación de la MAPK y separados por un único residuo (TXY, donde X puede ser glutámico, prolina o glicina, según el tipo de MAPK). Una vez activada, la MAPK fosforila a otras proteínas en residuos de serina y treonina en dominios consenso T/SP. Principalmente fosforila factores de transcripción, aunque también reguladores traduccionales, proteínas quinasas, fosfatasa u otras proteínas. Estos sustratos están relacionados con el metabolismo, morfología celular, progresión en el ciclo celular y la regulación de la expresión génica en respuesta a una gran variedad de señales extracelulares en células de mamíferos (Chen & Thorner, 2007). De esta forma, las MAPKs regulan una gran variedad de procesos biológicos esenciales, cuyas alteraciones están en muchos casos relacionadas con patologías humanas como el cáncer.

En muchas de estas rutas participan otros componentes, entre los que destacamos las proteínas de andamiaje, denominadas en inglés proteínas *scaffold*, que desempeñan la función de poner en contacto diferentes proteínas que participan en la señalización para facilitar la propagación de la señal, así como para aumentar la especificidad de la señalización evitando el entrecruzamiento entre distintas rutas de señalización (Dard & Peter, 2006). Forman así parte de los mecanismos de regulación que contribuyen a mantener la eficiencia y la especificidad en la transmisión de señales.

2. RUTAS DE MAPKS EN MAMÍFEROS

Las rutas de MAPKs no sólo se ocupan de la transmisión de la señal, sino que además amplifican e integran señales de diversos tipos para obtener una adecuada respuesta fisiológica. En mamíferos existen múltiples rutas de MAPKs que coordinadamente regulan diversas actividades celulares relacionadas con mitosis, metabolismo, proliferación celular, desarrollo, respuestas inflamatorias, supervivencia, diferenciación y apoptosis. Actualmente se han descrito hasta seis familias de MAPKs: ERK1/2 (*Extracellular Signal Regulated Kinases*), p38

(α , β , γ , δ), JNK 1/2/3 (*c-Jun N-terminal Kinases*) también denominadas SAPK (*Stress-Activated Protein Kinases*), ERK3/ERK4, ERK7/8 Y ERK5 (Krishna & Narang, 2008).

Las tres primeras familias son las más conocidas, su alteración está relacionada con enfermedades humanas y son utilizadas como dianas para el desarrollo de fármacos. Estos tres tipos de MAPKs poseen en el dominio de activación la secuencia conservada TXY, donde el aminoácido que se encuentra entre la treonina y la tirosina difiere en cada familia. Así en el caso de ERK1/2 es glutámico, en p38 es glicina y en el grupo de las JNKs es una prolina (Raman *et al.*, 2007).

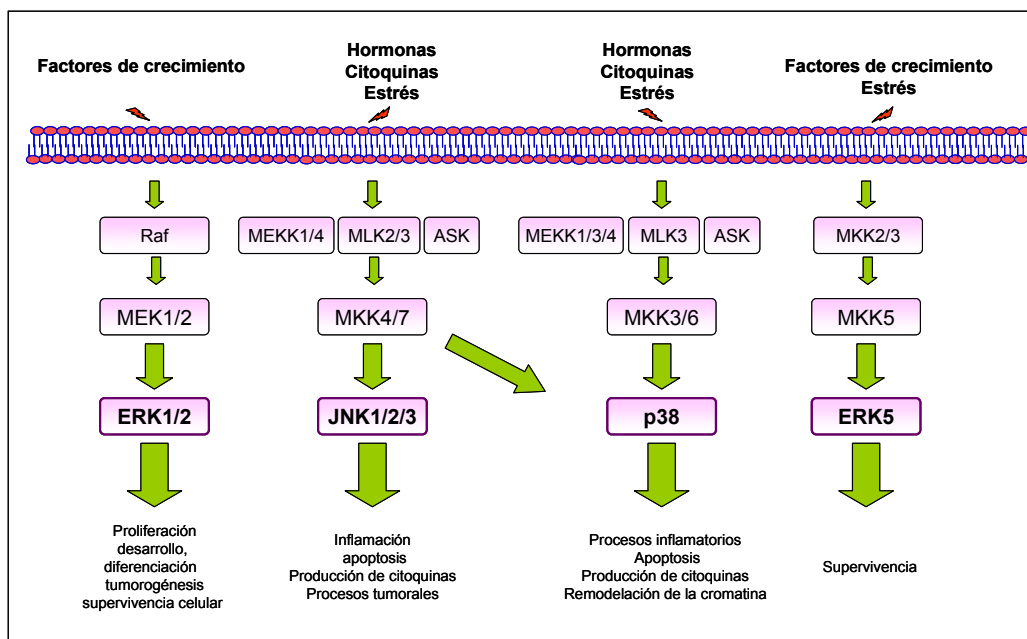


Figura 2. Esquema de las principales rutas de MAPKs en mamíferos. Adaptado de Raman y colaboradores (2007).

ERK1 y ERK2 comparten entre ellas un 83% de homología y regulan procesos celulares como proliferación, desarrollo, diferenciación y supervivencia celular. Se activan por estímulos mitogénicos como factores de crecimiento, citoquinas y ésteres de forbol que estimulan una gran variedad de receptores y proteínas G. Tras la unión de los ligandos a receptores tirosín quinasa o receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, se activa la proteína G monomérica Ras a través de su interacción con la GEF Sos, y ya en su forma activa unida a GTP, induce la activación del primer componente del módulo de MAPKs, formado por las distintas isoformas de Raf (A-Raf, B-Raf y Raf-1). Estas a su vez son las encargadas de activar las MAPKKs MEK1/MEK2 para que éstas fosforilen ERK1 y ERK2 (**figura 2**). Otras MAPKKKs que participan en la activación de ERK son c-Mos, TPL2 y MEKK1/2/3, las cuales actúan principalmente en procesos de meiosis, proliferación y respuesta a estrés respectivamente (Krishna & Narang, 2008). Dependiendo de la intensidad y duración de la estimulación, la activación de estas MAPKs puede favorecer la proliferación o la diferenciación. La señalización

es facilitada por la participación de distintas proteínas *scaffold* como la β -arrestina1/2, MP-1 (MEK *Partner-1*) o KSR (*Kinase suppressor of ras*), que interacciona con Raf, MEK y ERK, favoreciendo así la activación de la MAPK (Morrison & Davis, 2003). Entre los sustratos fosforilados por ERK1/2 podemos mencionar factores de transcripción como AP-1, NF κ B y Myc, y quinasas como Rsk (Roux & Blenis, 2004).

Las JNKs desempeñan un papel fundamental en la regulación de respuestas a varios tipos de estrés celular (estrés térmico, radiaciones UV, estrés osmótico, isquemia o presencia de citoquinas de inflamación). Para ello existen más de 10 isoformas que se expresan en diversos tejidos, aunque JNK3 se expresa únicamente en el cerebro. En este módulo opera un gran número de MAPKKs que son activadas a través de GTPasas de la familia Rho. Éstas activan las MAPKKs MEK4 y MEK7 encargadas de fosforilar de forma sinérgica a JNK (**figura 2**). Al igual que las ERK1/2 y p38, las JNKs pueden traslocarse del citoplasma al núcleo tras su estimulación. Un sustrato bien conocido es el factor de transcripción c-Jun, aunque también fosforila otros como ATF-2, NF-ATc1, HSF-1 y STAT3 (Roux & Blenis, 2004). Se regulan así procesos de inflamación, apoptosis, producción de citoquinas y procesos tumorales (Cowan & Storey, 2003). La ruta de señalización mediada por JNK esta regulada por distintas proteínas *scaffold*, si bien las JIP (*JNK Interacting Protein*) constituyen la principal clase de proteínas con esta función (JIP1, JIP2, JIP3, JIP4 o JLP). Todas ellas incluyen un dominio de unión a JNK (JBD), un dominio SH3 y un dominio de unión a fosfo-tirosina (Krishna & Narang, 2008). También la axina y POSH actúan como proteínas *scaffold* en esta ruta de señalización.

p38 juega un papel importante en procesos de activación de la respuesta inmune, estando implicada en enfermedades como el asma o de tipo autoinmune. Son activadas por una gran variedad de condiciones que provocan estrés celular tanto físico como químico: en presencia de hormonas, radiación UV, isquemia, temperatura, estrés osmótico y oxidativo. En esta ruta participan numerosas MAPKKs, mientras que tan sólo dos MAPKKs han sido identificadas: MEK3 y MEK6 (**figura 2**). Existen 4 isoformas de p38 (α, β, γ y δ), pudiendo todas ellas ser activadas por MEK6; sin embargo MEK3 sólo activa las dos primeras. MEK4 y MEK7 también pueden activar las isoformas de p38, indicando así un punto de entrecruzamiento entre las rutas JNK y p38 (Hu *et al.*, 1999). Entre los sustratos de p38 se incluyen importantes factores de transcripción como NF- κ B, p53 y ATF (Qi & Elion, 2005). Sorprendentemente hay pocas proteínas *scaffold* identificadas para los componentes de la ruta de p38. Entre ellas se encuentra OSM que, en respuesta a estrés osmótico, sitúa a p38 y a otras quinasas asociadas en la proximidad del citoesqueleto de actina, el cual debe reorganizarse para permitir la adaptación celular al estrés osmótico. También se han identificado otras proteínas de andamiaje como JIP y JSAPs, proteínas *scaffold* de JNKs, aunque aún no está claro como éstas últimas pueden unirse tanto a p38 como a JNK (Raman *et al.*, 2007).

Las MAPKs ERK3/4, ERK7/8 y ERK5, conocidas como MAPKs atípicas, son menos conocidas (Coulombe & Meloche, 2007). ERK5 pertenece al módulo de MAPKs que incluye las

MAPKKs MEKK2 y MEKK3, y la MAPKK MEK5 (**figura 2**); es activada por factores de crecimiento y es esencial para la angiogénesis y el desarrollo cardiovascular. ERK3 se conoce como MAPK atípica porque carece de los residuos conservados de treonina y tirosina presentes en el dominio de activación de las MAPKs y es principalmente regulada por su propia autofosforilación (Krishna & Narang, 2008).

3. RUTAS DE MAPKS EN LEVADURAS

El conocimiento de las rutas de señalización por MAPKs en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* más completo que el que tenemos en otros organismos. Aunque entre estas rutas existen muchas similitudes e incluso comparten múltiples componentes, la especificidad está regulada a distintos niveles con el fin de que no se produzca ningún entrecruzamiento entre ellas que se traduzca en errores de señalización. Están definidas cinco rutas de señalización mediadas por MAPKs: la ruta de apareamiento de la que forma parte la MAPK Fus3; la de filamentación-invasión cuya MAPK es Kss1, aunque esta MAPK también participa en el mantenimiento de la integridad celular y en el apareamiento; la ruta de integridad celular dirigida por la MAPK Slt2; la ruta de alta osmolaridad, de la que la MAPK Hog1 es responsable; y por último, la ruta implicada en la formación de la pared de la espora, en la que interviene la MAPK Smk1 (revisado por Chen y Thorner, 2007). También se ha descrito la presencia de una proteína quinasa, Mlp1, que presenta alto grado de identidad con la MAPK Slt2, aunque su función aún no está bien establecida.

3.1. Ruta de apareamiento

Las células haploides de *S. cerevisiae* pueden ser de dos tipos sexuales: a y α . Cada una de ellas es capaz de secretar al exterior celular una feromona peptídica (las células a liberan factor a y las células α liberan factor α), que estimulará los receptores de la superficie de las células del tipo sexual opuesto. La unión de las feromonas al receptor estimula la producción de respuestas celulares que incluyen cambios en la transcripción génica, parada del ciclo celular en la fase G1, y un crecimiento celular polarizado para formar unas proyecciones hacia la fuente de feromona, generándose células conocidas como *shmoo*s. Los *shmoo*s de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a un cigoto diploide que podrá iniciar un nuevo ciclo mitótico.

Para que este proceso tenga lugar es necesaria la activación de la ruta de apareamiento regulada por la MAPK Fus3. La activación de esta ruta comienza cuando se produce la unión del péptido correspondiente al receptor celular (Ste3 en células α y Ste2 en el caso de las células a), localizado en la membrana plasmática y asociado a una proteína G heterotrimérica (**figura 3**). Esta unión provoca el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α (Gpa1) de la proteína G, lo que determina su disociación de las subunidades $\beta\gamma$ (Ste4 y Ste18

respectivamente), capaces ya de interactuar con sus efectores (Ste20, Ste5 y Far1) (Dohlman & Thorner, 2001). La unión con sus efectores, principalmente con Far1, promueve el encuentro de la GTPasa Cdc42 con su activador Cdc24 (GEF). Por tanto, favorece el estado activo de Cdc42, necesario para activar posteriormente a Ste20, una PAK que actúa fosforilando y por tanto activando al primer componente del módulo de MAPK, la MAPKKK Ste11. Una vez fosforilada, Ste11 activa a la MAPKK Ste7 que a su vez activa a las MAPKs Fus3 y Kss1, siendo Fus3 la principal responsable de la respuesta a feromona, aunque Kss1 también participe en esta respuesta. En este proceso actúan también otros componentes, como Ste50, que se encarga de modular la activación de Ste11 (Ramezani-Rad, 2003); Bem1, que a través de su unión a Ste20 participa en su activación; y Ste5, proteína *scaffold* encargada de mantener la unión de los tres componentes del módulo de MAPKs (Ste11, Ste7 y Fus3) incrementando la especificidad de la cascada (Choi *et al.*, 1994). Esta proteína de andamiaje juega además un papel directo en la activación de Ste11 por la proteína G y Ste20; Ste5 se une a la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G, de forma que el reclutamiento membranal de Ste5 aproxima el módulo de MAPK a la membrana plasmática y a Ste20, para que una vez activada, esta PAK fosforile el primer componente del módulo de MAPKs, Ste11 (Elion, 2001; Garrenton *et al.*, 2009).

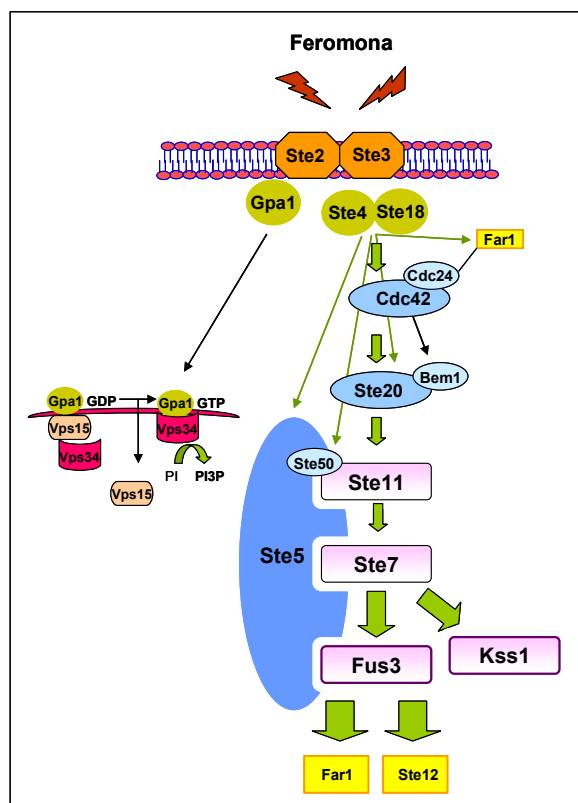


Figura 3. Esquema de la ruta de apareamiento de *S. cerevisiae*

Asimismo también se ha propuesto la existencia de una vía paralela de activación promovida por la subunidad α de la proteína G (Gpa1). La respuesta está mediada por la

participación de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) Vps34 y de una subunidad reguladora, Vps15. Ambos efectores se localizan en el endosoma, y la unión de Gpa1 en su forma activa a Vps34 provoca el aumento de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) (Slessareva *et al.*, 2006; Dohlman & Slessareva, 2006).

Una vez activado, Fus3 se trasloca al núcleo donde provoca la fosforilación del factor de transcripción Ste12, el cual activa la expresión de genes que tienen en su región promotora secuencias PRE (*Pheromone Response Element*) (Errede & Ammerer, 1989). Además Fus3 provoca la separación de Ste12 de sus represores transcripcionales Dig1 y Dig2, permitiendo así la activación transcripcional adecuada (Cook *et al.*, 1996). Otro sustrato sobre el que Fus3 actúa y fosforila en el núcleo es Far1, proteína que inhibe la Cdk Cdc28 unida a las ciclinas de fase G1, y provoca así la parada del ciclo celular en G1. En paralelo, Far1 se une a la subunidad $\beta\gamma$ y establece un sitio de crecimiento polarizado hacia la fuente de feromonas por reclutamiento de proteínas de polaridad (Butty *et al.*, 1998).

En condiciones normales de crecimiento, Fus3 se distribuye tanto en el núcleo como en el citoplasma celular; tras estimulación con feromona, la proporción de localización nuclear de Fus3 incrementa. Si bien tanto las proteínas nucleares Dig1 y Dig2 como Ste12 contribuyen a la retención de la forma fosforilada de Fus3 en el núcleo, la proteína fosfatasa Msg5 antagoniza este efecto (Blackwell *et al.*, 2007).

Como hemos mencionado anteriormente, además de Fus3, la MAPK Kss1 sufre una activación transitoria tras la estimulación por feromona, aunque a diferencia de lo que ocurre con Fus3, es independiente de la proteína *scaffold* Ste5 (Andersson *et al.*, 2004). Células carentes de ambas MAPKs son estériles, mientras que la presencia de tan sólo una de ellas permite el apareamiento, lo cual indica que ejercen funciones redundantes, siendo mayor la disminución de la eficiencia de apareamiento en ausencia de Fus3 (Ma *et al.*, 1995). Además, Fus3 es más eficaz que Kss1 en mediar la parada del ciclo celular a través de la represión transcripcional de ciclinas de fase G1 (Elion *et al.*, 1991). Por todo ello, Fus3 es el principal responsable de la señalización en respuesta a feromona aunque la activación de la MAPK Kss1 también sea necesaria en estas situaciones. Sin embargo, para la expresión de genes específicos de crecimiento filamentoso es necesario una activación más intensa de la MAPK Kss1 (Sabbagh *et al.*, 2001).

Fus3 actúa como regulador negativo de la ruta de crecimiento invasivo/filamentoso ya que, una vez activado, también fosforila y con ello induce la degradación del factor de transcripción Tec1 necesario para la inducción de genes relacionados con crecimiento invasivo/filamentoso. Es más, el nivel de activación de Fus3 limita tanto la cantidad como la duración de la activación de Kss1. De hecho, los niveles de fosforilación de Kss1 son mayores en ausencia de Fus3, mientras que la sobreexpresión de *FUS3* inhibe la fosforilación de Kss1, tanto en condiciones basales como tras estimulación con factor α . Una explicación posible de este hecho sería que Fus3 limitara esta activación de Kss1 regulando positivamente la expresión

o la actividad de un regulador negativo, como una fosfatasa, que actuaría diferencialmente sobre estas dos MAPKs, induciendo una retroalimentación negativa sobre Kss1 (Sabbagh *et al.*, 2001).

Tanto la degradación de Tec1 como la limitación de la activación de Kss1 inducida por Fus3 favorecen la especificidad en la señalización de cada una de las rutas de señalización (Bardwell, 2006). A esta especificidad también contribuye la proteína *scaffold* Ste5, que como comentamos, es capaz de interactuar con el módulo Ste11/Ste7/Fus3 pero no con Kss1, lo cual también evita el entrecruzamiento de la señalización entre ambas rutas que comparten las MAPKKK Ste11 y la MAPKK Ste7. Recientemente, se ha caracterizado un dominio en Ste5 que es necesario para permitir la fosforilación de Fus3, y no de Kss1, por la MAPKK Ste7, lo cual contribuye a la activación selectiva de Fus3 en condiciones de apareamiento (Good *et al.*, 2009).

Otros dos módulos de MAPKs adicionales al de Kss1 se encuentran vinculados a la ruta de apareamiento en respuesta a feromona, bien sea por compartir elementos comunes de las rutas o a través de relaciones funcionales. Así, la ruta de integridad celular se activa por estrés de la superficie celular, situación que ocurre durante la formación de las prolongaciones celulares inducidas en presencia de feromona. De hecho, mutantes afectados en esta ruta sufren lisis celular durante la morfogénesis inducida por feromona, poniendo de manifiesto así la relevancia de la reorganización del citoesqueleto de actina durante la formación de las proyecciones inducidas por feromona (Levin, 2005). También la ruta HOG, al igual que la ruta de filamentación, comparte componentes de la ruta de apareamiento, como Ste20 y Ste11. Sin embargo, la activación de las rutas de Hog1 y Kss1 ante estrés hipertónico o cambios nutricionales del entorno respectivamente, no activa la respuesta de apareamiento en células silvestres, lo cual sugiere que estos componentes se reúnen formando complejos independientes (Roberts *et al.*, 2000).

3.1.1 Respuesta transcripcional regulada por la ruta de apareamiento

Tras exposición a feromona, se ha encontrado realizando estudios transcriptómicos que más de 200 genes incrementan su expresión y otros tantos la reprimen. Se observa inducción de genes específicos de cada tipo sexual (como por ejemplo *ASG7* en células tipo α y *MF α 2* en células tipo α), además de un perfil de respuesta transcripcional común (Roberts *et al.*, 2000). Se induce la expresión de genes de cada fase de la respuesta de apareamiento, como los implicados en el proceso de diferenciación celular desde el control de la polaridad celular a la fusión celular y nuclear (*FUS2*, *AGA1*, y los denominados *Factor Induced Gene* *FIG1*, *FIG2*, *FIG3* Y *FIG4*) (Erdman *et al.*, 1998). Entre ellos, genes como *FUS1* o *PRM1* no tienen inducción basal, pero en respuesta a feromona aumentan su expresión debido a la presencia de tres motivos PRE en su secuencia promotora (Trueheart *et al.*, 1987). Asimismo, existen genes que, además de estas secuencias PRE, poseen otros sitios de unión a otra clase de factores de

transcripción. Por ello, mantienen un nivel de expresión basal más elevado que se induce tras estimulación con feromona (Flessel *et al.*, 1989).

Mediante análisis de *ChIP-on-chip* se ha identificado un alto número de promotores de genes relacionados con apareamiento y filamentación que muestran asociación con Ste12 (Zeitlinger *et al.*, 2003). Asimismo, en los últimos años, estudios de este tipo empleando la metodología de *chips* de DNA o secuenciación, han permitido ampliar el conocimiento de estas uniones (Borneman *et al.*, 2006; Borneman *et al.*, 2007b; Lefrancois *et al.*, 2009). Por ejemplo, la variante *ChIP-Seq* se ha empleado para analizar a gran escala en el genoma, los sitios de unión de promotores al factor de transcripción Ste12, entre otros (Lefrancois *et al.*, 2009); se han descrito un alto número de sitios de unión a Ste12, un 67% de ellos coincidentes con los identificados en otro análisis reciente de *ChIP-on-chip* (Borneman *et al.*, 2007a).

Entre los genes que inducen su expresión en respuesta a feromona, además de los que codifican proteínas necesarias para el reconocimiento y fusión celular, se encuentran aquellos que codifican componentes de la propia ruta (mecanismo de retroalimentación positiva) como *STE2*, *FUS3* o *FAR1*, así como factores que actúan regulando negativamente la activación de esta ruta (retroalimentación negativa) como *SST2*, *PTP2*, *MSG5* o *GPA1* (Chen & Thorner, 2007).

Como consecuencia del crecimiento polarizado que la célula experimenta en presencia de feromona para formar *shmoo*s, se producen cambios en la expresión génica que se correlacionan con la formación de nueva pared celular. Por ello existe una respuesta transcripcional adicional en la que se inducen genes implicados en la construcción y remodelación de la pared celular, genes relacionados con la ruta de integridad celular (por ejemplo *SLT2*, *MLP1* o *RLM1*), además de genes regulados por la activación de dicha ruta (Roberts *et al.*, 2000). Sin embargo, la expresión de genes responsables de la progresión del ciclo celular, replicación del DNA, gemación y mitosis, se encuentra reprimida tras tratamiento con feromonas (Roberts *et al.*, 2000).

El análisis de los perfiles de expresión del genoma tras estimulación con feromona en cepas carentes de Fus3 o de Kss1 indica que la presencia de cada una de estas MAPKs por separado es suficiente para activar el programa transcripcional característico del apareamiento a través de la activación del factor de transcripción Ste12 (Breitkreutz *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2000).

3.2. Ruta de crecimiento invasivo/pseudofilamentoso

Cuando las células se encuentran en un medio con limitación de nutrientes, experimentan una serie de cambios morfológicos: las células se alargan y el patrón de gemación pasa de ser bipolar a unipolar. Ante la falta de nitrógeno las células diploides manifiestan un crecimiento pseudohifal, mientras que las células haploides experimentan un crecimiento invasivo en ausencia de glucosa (Roberts & Fink, 1994). El fin último de todas estas

modificaciones es conseguir que las células aumenten su capacidad de adhesión entre ellas y de penetración en el medio que les rodea para poder así conseguir los nutrientes existentes en tal medio (Gancedo, 2001).

La principal ruta responsable de desencadenar estos cambios es la que desemboca en la MAPK Kss1, la cual comparte múltiples componentes con la ruta de apareamiento (**figura 4**). Para el crecimiento filamentoso se requiere la activación de dos rutas adicionales. En una de ellas participa la proteína quinasa dependiente de 5'-AMP (AMPK) Snf1, en respuesta a las limitaciones de glucosa (Kuchin *et al.*, 2003) y en la otra interviene un receptor acoplado a proteína G, Gpr1 (Lorenz *et al.*, 2000), que señala a través de la subunidad α de la proteína G Gpa2, que junto con Ras regula la producción de cAMP y la activación de la proteína quinasa A (y sus subunidades catalíticas Tpk1, Tpk2 y Tpk3) (Palecek *et al.*, 2002).

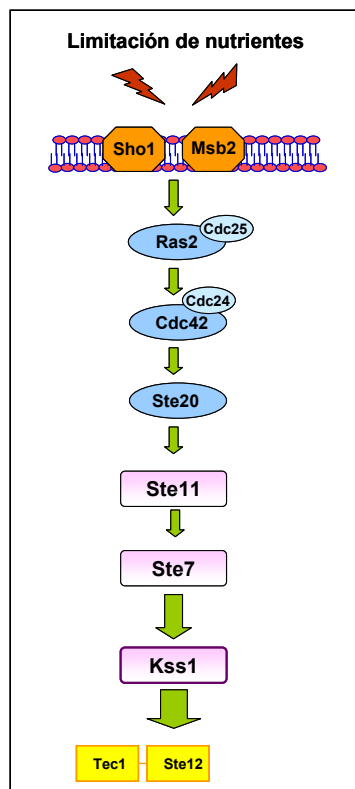


Figura 4. Esquema de la ruta de pseudofilamentación y de crecimiento invasivo de *S. cerevisiae*

En la ruta filamentación en la que está implicada la MAPK Kss1, los sensores Sho1 (también osmosensor de la ruta de alta osmolaridad mediada por Hog1) y Msb2 forman un complejo esencial para la activación de esta MAPK. Msb2 interacciona tanto con Cdc42 como con Sho1 para promover el crecimiento filamentoso (Cullen *et al.*, 2004). La señal se transmite a la GTPasa Ras2 que activa la proteína de tipo GEF Cdc24, necesaria para la activación de la siguiente GTPasa, Cdc42. Además parece que para la activación de Ras2 es necesario que se estimule también la actividad de su GEF Cdc25. Así, Cdc42 activa posteriormente a la PAK Ste20 (Leberer *et al.*, 1997), que transmite la señal al módulo de MAPK compuesto por Ste11, Ste7 y

la MAPK Kss1. La activación de Kss1 da lugar a la fosforilación del factor de transcripción Ste12, separándose así de sus represores transcripcionales Dig1 y Dig2. A la par se produce la unión de Ste12 al factor de transcripción Tec1 para que se produzca la transcripción específica de los genes que contienen en su promotor secuencias FRE (*filamentation responsive element*), formada por una secuencia TCS (*Tec1-binding site*) y a continuación la secuencia PRE (*pheromone response element*).

No todos los genes de filamentación poseen secuencias FRE en sus promotores, pero sí secuencias TCS. El factor de transcripción Tec1 no tiene actividad transcripcional por sí mismo. Por ello se ha propuesto que Tec1 forma un complejo con Ste12 sobre las secuencias TCS, de manera que la actividad transcripcional de Ste12 permite la expresión de estos genes de filamentación. Éste sería un mecanismo por el cual Ste12 puede controlar la transcripción de distintas rutas por su asociación con distintos factores (Chou *et al.*, 2006).

A diferencia de lo que ocurre con el modulo de MAPKs de la ruta de apareamiento, en la ruta de filamentación no es necesaria la actuación de Ste5 como proteína de andamiaje para la activación de Kss1. También les diferencia el hecho de que la fosfatasa Msg5 inhibe a Fus3 tanto en condiciones basales, como de estimulación por feromona, mientras que Kss1 parece no verse afectada por la acción de esta fosfatasa (Andersson *et al.*, 2004).

La pérdida de Kss1, o todas las MAPKs descritas en la levadura, no impide la formación de pseudofilamentos (Liu *et al.*, 1993). Sin embargo, trabajos realizados con alelos mutados de Kss1, han permitido observar que la presencia de una proteína Kss1 no fosforilable, y por tanto sin posibilidad de activarse, impide la formación de pseudohifas (Madhani & Fink, 1997). Estas observaciones han permitido postular que, siendo la forma fosforilada de Kss1 un activador de la ruta, la forma no fosforilada se comportaría como un represor al unirse a Ste12 e impedir su unión a los promotores para promover la transcripción de genes que contienen secuencias FRE.

Se ha propuesto la existencia de otra ruta de MAPKs implicada en el mantenimiento de la integridad celular en condiciones de crecimiento vegetativo. Es la ruta SVG (*STE vegetative growth*), que comparte muchos elementos con la ruta de apareamiento y la ruta de crecimiento invasivo (Ste20, Ste50, Ste11, Ste7, Kss1 y Ste12). Esta ruta se mantiene inhibida en condiciones basales por la MAPK Fus3 y se activa cuando se producen daños en pared como los ocurridos en mutantes *och1Δ* de la ruta de glicosilación, incapaces de sintetizar manoproteínas. Esta activación induce la expresión del gen *FKS2*, que codifica una subunidad catalítica de la enzima glucan sintasa. La inactivación simultánea de la ruta de integridad celular y de la ruta SVG (*bck1Δste11Δ*) causa defectos sintéticos de crecimiento. Todos los datos sugieren que ambas rutas ejercen funciones paralelas y aditivas para mantener la integridad celular (Lee & Elion, 1999). Se ha propuesto que Sho1 constituye el sensor de esta ruta, y que, junto con el resto de componentes, es responsable de los cambios en la glicosilación de proteínas y la expresión del gen *FUS1* en mutantes afectados en este proceso (Cullen *et al.*, 2000).

3.2.1 Respuesta transcripcional regulada por la ruta de crecimiento invasivo/pseudofilamentoso

La transcripción específica de genes relacionados con la filamentación en *S. cerevisiae* depende de la unión del factor de transcripción Tec1, activado por Kss1 y formando complejo con Ste12, a secuencias TCS o FRE, (*filamentous responsive element*) (Madhani & Fink, 1997). Se ha observado mediante análisis de *ChIP-on-chip* que los promotores de genes relacionados con el crecimiento filamentoso poseen sitios de unión para los factores de transcripción de Ste12 o Tec1 (Borneman *et al.*, 2007b), y también para otros factores de transcripción como Flo8 o Mga1 que operan en la ruta del AMPc durante el crecimiento filamentoso (Borneman *et al.*, 2006). También mediante este tipo de ensayos se ha descrito, en presencia de butanol, la asociación de Ste12 preferentemente a genes que codifican ciclinas de fase G1, a genes que regulan el crecimiento polarizado y la gemación como *ACT1*, *BEM1* o *BUD14*, así como a genes que se inducen en estas situaciones como *ADE1*, *CWP1* u *OPY2* (Zeitlinger *et al.*, 2003).

Uno de los genes regulados por la ruta en la que participa la MAPK Kss1 es *FLO11/MUC1*, que codifica una glucoproteína de la superficie celular necesaria para la adhesión celular y el correcto crecimiento invasivo o filamentoso (Lo & Dranginis, 1996). Se han identificado otros efectores de la ruta de filamentación regulada por la MAPK Kss1 examinando los perfiles de transcripción de cepas que sobreexpresaban *TEC1* frente a aquellas carentes de este gen (ya que *TEC1* actúa específicamente en esta ruta) en condiciones que inducen el crecimiento invasivo o filamentoso. En células haploides, además de *FLO11*, otros genes muestran inducción transcripcional como *PGU1*, gen que codifica una endopoligalactorunasa que favorece el crecimiento invasivo a través del ataque enzimático al medio en el que se encuentre, y *CLN1*, un regulador morfogénico esencial para el crecimiento filamentoso en células diploides (Madhani *et al.*, 1999).

La mayoría de los genes que se encuentran regulados por la MAPK Kss1 en células haploides no son necesarios para el crecimiento invasivo, ya que no son esenciales para el proceso morfogénico de tal manera que podrían jugar un papel redundante o bien podrían participar en procesos relacionados. Asimismo un tercio de los genes regulados bajo condiciones de crecimiento pseudofilamentoso también aumentan su inducción transcripcional durante la fase G1 y S del ciclo celular, lo cual sugiere una posible conexión entre ambos procesos. De hecho, el crecimiento filamentoso se asocia con un ciclo celular alterado, con un retraso en la fase G2 (Madhani *et al.*, 1999).

Adicionales análisis de expresión génica en condiciones de activación de la ruta de Kss1 por defectos en la glicosilación y durante crecimiento filamentoso han permitido ampliar el escaso conocimiento sobre los genes diana regulados por la ruta de Kss1. Además de los genes ya conocidos (*KSS1*, *YLR042c*, *SVS1*, y elementos Ty1) (Roberts *et al.*, 2000), se identificaron otros como *URA1*, *YLR343w* o *MSB2*; este último codifica una proteína de la superficie celular

que actúa como componente de la ruta de señalización que regula el crecimiento filamentoso (Cullen *et al.*, 2004).

Como se ha comentado, determinados alcoholes actúan como moléculas de señalización que inducen la formación de filamentos en la levadura, ya que son el producto final del catabolismo de los aminoácidos que quedan en el medio cuando éste carece de las fuentes de nitrógeno preferidas por las células. También en estas situaciones se ha estudiado la respuesta transcripcional mediante *microarrays* de DNA, la cual muestra inducción de unos 16 genes como *DLD3* (codifica una lactato deshidrogenasa) o *PDR5* (bomba de membrana plásmática asociada a ATO). Asimismo, 5 genes reprimen su expresión (*AGP1*, *GAP1*...), no siendo ninguno de ellos necesario para la filamentación (Dickinson, 2008).

Ya que la ruta de filamentación regulada por Kss1 comparte múltiples componentes con la ruta de apareamiento, se ha estudiado qué genes muestran inducción transcripcional específica de Fus3 o de Kss1. Para ello, se han usado cepas carentes de cada una de estas MAPKs por separado. Células carentes de Kss1, tanto en crecimiento vegetativo como en presencia de feromona, muestran patrones transcripcionales similares a los observados en células silvestres. Sin embargo, mutantes *fus3Δ* muestran una inducción preferente de genes de filamentación en condiciones basales, aunque también tras estimulación con feromona (además de los genes de apareamiento), dependiente del factor de transcripción Tec1. El análisis de estos perfiles de expresión para estas dos MAPKs revela que existe una superposición de funciones entre ellas, en las respuestas de apareamiento y de crecimiento filamentoso y que Fus3 actúa como regulador negativo de la ruta de invasividad (Breitkreutz *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2000).

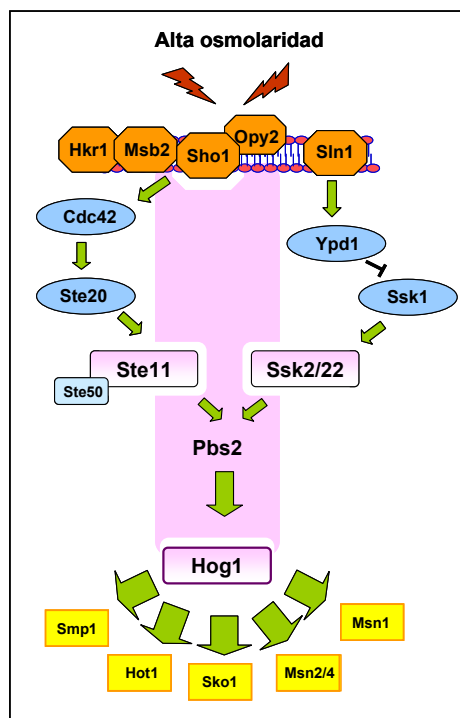
3.3. Ruta de respuesta a alta osmolaridad

Los cambios en la concentración de solutos en el medio son detectados como un estrés por la célula, de manera que ésta pone en marcha mecanismos que le permitan la adaptación y supervivencia ante esta situación. Se activa así la ruta de señalización de respuesta a alta osmolaridad, que permite la fosforilación, activación y traslocación nuclear de la MAPK Hog1. Esta activación principalmente promueve la generación de solutos, como glicerol, para mantener así el equilibrio osmótico y permitir la adaptación de la célula a los cambios medioambientales (Hohmann, 2002). Asimismo, se han descrito otras situaciones que inducen la activación de la MAPK Hog1, como en presencia de arsenito (Sotelo & Rodriguez-Gabriel, 2006), de peróxido de hidrógeno (Staleva *et al.*, 2004), de nistatina (Reiser *et al.*, 2003) o tras choque térmico (Winkler *et al.*, 2002).

La levadura puede percibir el estímulo externo a través de dos posibles osmosensores, Sln1 y Sho1, lo que hace que se pueda transmitir la señal por dos ramas diferentes, siendo cada uno de ellos distintos e independientes entre sí (**figura 5**). La señalización de estas dos ramas converge en la MAPKK Pbs2, activador específico de la MAPK Hog1 (Maeda *et al.*, 1994).

La proteína transmembranal Sln1 posee un dominio que actúa como sensor extracelular y un dominio citoplasmático con actividad histidín quinasa. En condiciones normales de osmolaridad, Sln1 está activa y cataliza su propia fosforilación y la consecuente transferencia de fosfato y por tanto activación de una proteína intermediaria, Ypd1. Ésta a su vez fosforila a la proteína reguladora Ssk1, evitando así su interacción con las MAPKKKs Ssk2 y Ssk22 y por tanto la activación de la ruta de Hog1. Sin embargo, en condiciones de alta osmolaridad este osmosensor está inhibido, con la consiguiente desfosforilación de Ssk1, capaz en estas condiciones de interactuar con Ssk2 y Ssk22. Estas dos MAPKKKs fosforilan a la MAPK Pbs2, la cual es responsable de la doble fosforilación y activación de la MAPK Hog1 (Posas *et al.*, 1998).

Figura 5. Esquema de la ruta de respuesta a alta osmolaridad de *S. cerevisiae*



Sho1 se localiza principalmente en las zonas de crecimiento polarizado, contiene cuatro segmentos transmembranales y un dominio SH3 (*Src Homology*) citoplasmático que se une a una zona rica en prolinas situada en la zona amino-terminal de Pbs2. Otros dos posibles osmosensores para esta rama en la que participa Sho1 son las proteínas transmembranales Hkr1 y Msb2, capaces de formar un complejo con Sho1 tras un aumento de osmolaridad del medio externo (Tatebayashi *et al.*, 2007). La presencia de Sho1 es absolutamente necesaria para la activación de la MAPK Hog1 a través de esta rama. Otros componentes que forman parte de esta ruta y que son comunes con la vía de apareamiento y de filamentación son Cdc42, Ste20, Ste50 y Ste11. Ésta última MAPKKK será la encargada de activar a la MAPKK Pbs2. Pbs2 constituye una proteína que actúa como plataforma de ensamblaje ya que además de interactuar con Sho1, interactúa con Ste11 y Hog1, por lo que se ha propuesto su papel

como proteína de andamiaje de la ruta de respuesta a alta osmolaridad, favoreciendo así la especificidad de esta ruta y evitando el entrecruzamiento con otras rutas (apareamiento y filamentación) con las que comparte elementos (Posas & Saito, 1997). Recientemente, se ha comprobado que la retrofosforilación que ejerce la MAPK Hog1 sobre la proteína común en otras rutas Ste50, también contribuye a esta especificidad, ya que limita la duración de la activación de Kss1 y evita el crecimiento invasivo en condiciones de alta osmolaridad (Hao *et al.*, 2008). Además, Ste50 asegura la localización de Ste11 en la membrana uniéndose, en condiciones de choque osmótico, a la GTPasa necesaria para la activación de Ste20, Cdc42; también la unión de Ste50 a Opy2, facilita la transmisión del estímulo (Wu *et al.*, 2006). El siguiente paso una vez activado Ste11, termina en la activación de Pbs2 necesaria para la transmisión de este estímulo.

La fosforilación de Pbs2 tanto por Ste11 como por Ssk2 y Ssk22 induce a su vez la fosforilación de la MAPK Hog1. Finalmente, cuando Hog1 está activa, se trasloca al núcleo para fosforilar factores de transcripción que activan la transcripción de genes cuyos promotores contienen la secuencia STRE (*Stress Response Element*). Entre los factores de transcripción sobre los que actúa Hog1 se han descrito Smp1, Sko1 (represor), Msn2/Msn4 (activadores), Msn1 y el activador Hot1.

3.3.1 Respuesta transcripcional regulada por la ruta de respuesta a alta osmolaridad

Estudios del transcriptoma celular en condiciones de estrés osmótico han demostrado que un gran número de genes sufren cambios significativos aunque transitorios en sus niveles de expresión, y que la MAPK Hog1 es necesaria sólo para una parte de la respuesta transcripcional observada, por otro lado la más intensa (de Nadal *et al.*, 2002). El número de genes inducidos (200-400) o reprimidos (150-250) en condiciones de estrés hiperosmótico varía en función de las condiciones de crecimiento y de las condiciones aplicadas en cada estudio. Estos genes están implicados principalmente en el metabolismo de carbohidratos, en la protección general ante estrés, en la producción de proteínas y la transducción de señales. Es frecuente encontrar una repuesta similar ante otros tipos de estrés, como los asociados a cambios de temperatura, oxidación, pH o nutrientes en el medio extracelular (Hohmann, 2002).

No existe un grupo de genes cuya expresión se induzca por estrés osmótico y cuya eliminación de forma individual afecte al crecimiento en condiciones de alta osmolaridad (Warringer *et al.*, 2003). Alguno de los genes inducidos en respuesta a estrés, como aquellos que codifican enzimas necesarias para la producción de glicerol, se encuentran por duplicado en la célula, de manera que tan sólo una de las copias se ve afectada en respuesta a estrés. Así, su delección, es en parte compensada por la presencia de la segunda isoforma en la célula.

De hecho recientemente se ha descrito que, en respuesta a estrés osmótico, el anclaje de Hog1 a la membrana plasmática o su falta de traslocación nuclear no impiden la supervivencia celular en estas condiciones a pesar de que, a causa de ello, la respuesta

transcripcional sea parecida a la mostrada por mutantes *hog1Δ*. Tampoco se necesita en estas situaciones la presencia de los factores de transcripción regulados por Hog1, ni MAPKKs ni los canales de transporte de glicerol e iones; tan sólo es esencial para el mantenimiento del equilibrio osmótico la expresión de genes relacionados con la síntesis de glicerol (Westfall *et al.*, 2008).

Los genes que se encuentran reprimidos en respuesta a choque osmótico (relacionados con proteínas ribosomales, factores de traducción, enzimas glicolíticas) están regulados positivamente por la proteína quinasa A, lo que parece indicar la existencia de un efecto antagónico entre ambas rutas (Hohmann *et al.*, 2007).

Como ya se ha comentado, varios factores de transcripción están implicados en la respuesta desencadenada por Hog1; el factor de transcripción Hot1 regulado por Hog1 es el responsable de la regulación transcripcional de al menos 10 genes; entre ellos, induce la transcripción de *GPD1* para la síntesis de glicerol e inhibe la expresión de *FPS1* que expulsa glicerol al exterior. Sko1 controla la expresión de varios reguladores de sistema de osmorespuesta, como el factor de transcripción Msn2/4 y la proteína fosfatasa Ptp3, siendo un elemento clave para la respuesta adaptativa a estrés. Las proteínas redundantes Msn2 y Msn4, necesarias para las respuestas transcripcionales a un amplio rango de condiciones de estrés, requieren a la quinasa Hog1 para ejercer esta función (Rep *et al.*, 2000). La propia MAPK Hog1 por si misma actúa como factor activador de la transcripción para sus dianas. Además, Hog1 no sólo recluta la DNA-polimerasa II a genes diana, sino también complejos remodeladores de cromatina (Mas *et al.*, 2009). Asimismo, también participa en la fase de elongación transcripcional (Pokholok *et al.*, 2006).

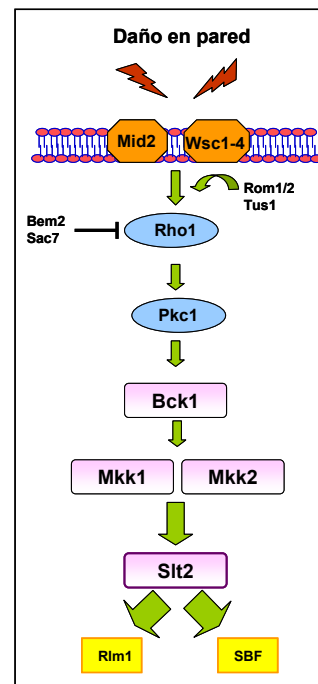
3.4. Ruta de integridad celular

La pared celular de la levadura *S. cerevisiae* es una estructura esencial para el mantenimiento de la forma y la integridad celular. Esta pared sufre remodelamientos durante el crecimiento vegetativo o durante la morfogénesis inducida por feromonas, así como en condiciones que suponen un peligro para su integridad. La ruta de transducción que regula esta remodelación de la pared y por tanto es responsable de mantenerla estable es la mediada por la MAPK Slt2. Esta ruta se activa, por tanto, frente a una gran variedad de estímulos y condiciones que alteran la pared celular, como la exposición a agentes de unión a quitina (rojo Congo o el Blanco de Calcofluor), tratamiento con glucanasas (zimoliasa), choque hipotónico, alta temperatura, estrés oxidativo, o despolarización del citoesqueleto de actina (revisado por Levin, 2005).

Entre los componentes de esta ruta se incluyen la GTPasa Rho1, que activa a la quinasa Pkc1 y ésta a su vez activa al módulo conservado de MAPKs, constituido por la MAPKKK Bck1, dos MAPKKs redundantes, Mkk1 y Mkk2, y la MAPK Slt2, también denominada Mpk1. Esta MAPK activada fosforila a los factores de transcripción Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*,

1997) y SBF (compuesto por Swi4 y Swi6) (Madden *et al.*, 1997), permitiendo su unión a los promotores de los genes que presentan sitios de unión para el correspondiente factor de transcripción, induciendo así su expresión (**figura 6**).

Figura 6. Esquema de la ruta de integridad celular de *S. cerevisiae*



Se conocen seis proteínas de membrana importantes para la activación de esta ruta: Wsc1, Wsc2, Wsc3, Wsc4, Mid2 y Mtl1, que actúan como mecanosensores de estrés aunque no perfectamente establecido el mecanismo por el que lo hacen. Los principales activadores de esta ruta son Wsc1 y Mid2, ya que la delección de ambos produce un fenotipo inviable en ausencia de estabilización osmótica. La delección de genes *WSC* provoca hipersensibilidad ante etanol, peróxido de hidrógeno o fármacos que dañan el DNA (Zu *et al.*, 2001). La delección de *MTL1* también agrava la termosensibilidad de un mutante *mid2Δ*, lo cual sugiere que pudieran compartir funciones dentro de la ruta de integridad celular (Rajavel *et al.*, 1999). Mid2 activa la ruta en presencia de vanadato, temperatura (Martin *et al.*, 2000) o blanco de calcoflúor (de Nobel *et al.*, 2000). Los dominios citoplasmáticos C-terminales de Wsc1 y Mid2 interaccionan con la GEF Rom2 favoreciendo así la activación Rho1 y posterior activación de la ruta (Philip & Levin, 2001).

La GTPasa Rho1 es la subunidad reguladora de la β -1,3 glucan sintasa, y ejerce por tanto una función directa sobre la biosíntesis de la pared celular. Además desempeña la función de unirse y activar a la proteína quinasa Pkc1 así como a elementos de otras rutas: las forminas Bni1 y Bnr1 implicadas en la formación de la actina (Imamura *et al.*, 1997), las dos subunidades efectoras de la citada β -1,3 glucan sintasa (Fks1 y Fks2), la proteína Sec3 (subunidad del

complejo regulador de la ruta de secreción) (Roumanie *et al.*, 2005) y el factor de transcripción Skn7 (Alberts *et al.*, 1998). Rho1 es activado por las GEFs (reguladores positivos) Rom1, Rom2 (Ozaki *et al.*, 1996), y Tus1 (Schmelzle & Hall, 2000) mientras que Bem2 y Sac7 actúan como GAPs implicadas en la regulación negativa de Rho1 como activador sobre Pkc1 (Martin *et al.*, 2000).

La quinasa Pkc1 fue el primer componente de la ruta identificado (Levin *et al.*, 1990). Al igual que Rho1, esta proteína es esencial y se localiza en sitios de crecimiento polarizado. Aunque probablemente Pkc1 tiene muchos sustratos intracelulares, sólo se conoce bien la regulación que ejerce sobre el módulo de MAPK de la ruta de integridad celular. Su delección es letal para la célula en condiciones normales de crecimiento aunque rescatable por estabilización osmótica. La pérdida de cualquier proteína del módulo de MAPK que actúa de forma posterior a Pkc1, induce lisis celular sólo a elevadas temperaturas, defecto remediable con estabilización osmótica. Por tanto, la pérdida de Pkc1 provoca daños más severos de los que se producen por la pérdida de cualquiera de los miembros del módulo de MAPKs que está bajo su control, lo cual sugiere que Pkc1 podría regular múltiples rutas (revisado por Levin, 2005). Se han descrito otros elementos de la ruta que parecen actuar por encima de Pkc1, como las quinasas Pkh1 y Pkh2, que activan a Pkc1 (Inagaki *et al.*, 1999).

Pkc1 fosforila el primer componente del módulo de MAPKs de la ruta de integridad celular, la MAPKKK Bck1. Esta proteína es fosforilada *in vitro* por Pkc1 en varios residuos que parecen estar implicados en su activación, ya que la mutación en esta región activa constitutivamente a Bck1 (Levin *et al.*, 1994). Bck1 activada fosforila a las MAPKKs redundantes Mkk1 y Mkk2. Ambas MKKs interaccionan con la MAPK Slt2 (Soler *et al.*, 1995), pero tan sólo Mkk1 es capaz de interaccionar con Pkc1 (Paravicini & Friedli, 1996). Recientemente se ha descrito la existencia de un mecanismo de retrofosforilación por Slt2 sobre sus MAPKKs tras condiciones de activación de esta ruta que podría tener un papel importante en la retroalimentación positiva de la ruta (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2007). El hecho de que sea necesaria la presencia de la proteína Spa2 del complejo polarisoma para la localización de Slt2, Mkk1 y Mkk2 en los sitios de crecimiento polarizado, y que Spa2 interaccione con las tres quinasas, ha llevado a proponer a Spa2 como proteína *scaffold* de la ruta en condiciones de crecimiento polarizado (van Drogen & Peter, 2002).

Mkk1 y Mkk2 fosforilan y activan a la MAP quinasa Slt2 (Irie *et al.*, 1993). Una vez fosforilada, esta MAPK se asocia con la chaperona Hsp90, lo cual resulta esencial para que Slt2 pueda fosforilar y por tanto activar al factor de transcripción Rlm1 (Millson *et al.*, 2005).

Rlm1 es un miembro de la familia de factores de transcripción del tipo MADS (*MCM1*, *Agamous*, *Deficiens*, *SERUM response factor*) y el principal responsable de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de la pared o ensamblaje de sus componentes (Jung & Levin, 1999). Rlm1 presenta la misma especificidad de unión que el factor de transcripción MEF2 de mamíferos y también está estrechamente relacionado con el factor de transcripción Smp1 (*second MEF2-like protein 1*) presente en levaduras (Dodou & Treisman, 1997). Fue

identificado porque su delección eliminaba la letalidad provocada por la sobreexpresión de una versión constitutivamente activa de Mkk1, *Mkk1^{S386T}* (Watanabe *et al.*, 1995). Rlm1 se localiza en el núcleo, y su fosforilación por Slt2 en dos residuos presentes en su dominio de activación (Ser⁴²⁷ y Thr⁴³⁹) estimula su actividad transcripcional (Jung *et al.*, 2002).

Sorprendentemente, a diferencia de lo que ocurre en mutantes de la ruta de integridad celular, la delección de *RLM1* no produce fenotipos de sensibilidad a estímulos que afectan a la pared celular, como alta temperatura, carencia de nitrógeno o presencia de glicerol en el medio; únicamente provoca un leve fenotipo de sensibilidad a cafeína (Watanabe *et al.*, 1995); incluso las cepas *rlm1Δ* no manifiestan sensibilidad a agentes como Blanco de Calcoflúor o zimoliasa. Sin embargo, se sabe que regula la respuesta transcripcional mayoritaria frente a muchos de estos agentes (temperatura, zimoliasa, rojo Congo...). La sobreexpresión de *RLM1* suprime la sensibilidad a cafeína y a choque térmico en mutantes *bck1Δ* y *slt2Δ* (Watanabe *et al.*, 1995). Además, el hecho de que el defecto fenotípico de un mutante *rlm1Δ* en presencia de cafeína sea más leve que el que muestra un mutante *slt2Δ*, sugiere que Slt2 fosforila sustratos adicionales relacionados con esta respuesta (Watanabe *et al.*, 1995). Posteriormente, Kuranda y colaboradores demostraron que la fosforilación de Slt2 inducida en presencia de cafeína no conlleva la activación de la respuesta transcripcional mediada por Rlm1 (Kuranda *et al.*, 2006).

Ensayos de interacción mediante el sistema de dos híbridos mostraron interacción de Rlm1 con Slt2, y también con Mlp1 (*Mpk1-like protein kinase*), una posible proteína quinasa con alta similitud a la MAPK Slt2 (Watanabe *et al.*, 1997). De hecho, ambas quinasas se unen a la misma región de Rlm1. Sin embargo, Mlp1 carece del característico motivo conservado en las MAPKs (T-X-Y) esencial para la activación de este tipo de quinasas, estando reemplazada la treonina por una lisina.

Varios hechos relacionan a Mlp1 con la integridad celular a través de Rlm1. Los niveles de expresión de esta proteína se inducen de manera significativa en respuesta a estrés de pared celular de manera dependiente de la activación de Rlm1 por Slt2. La delección de *MLP1* aumenta la sensibilidad a cafeína en un mutante *slt2Δ*, mientras que su sobreexpresión suprime la sensibilidad de un mutante *bck1Δ* a estímulos que dependen fundamentalmente de Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1997). Estos fenotipos tan leves sugieren que Mlp1 es una "pseudoquinasa" que contribuye a través de Rlm1 al mantenimiento de la integridad celular. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado una relación directa entre Mlp1 y la respuesta de esta ruta regulada por Rlm1. Se ha descrito un nuevo mecanismo en el que tanto Mlp1 (que es inactiva catalíticamente) como Slt2 fosforilado (pero sin necesidad de tener actividad quinasa), inducen la expresión de *FKS2* (gen que codifica una glucan sintasa implicada en la síntesis de la pared celular cuya inducción es independiente de Rlm1) a través de la asociación con el factor de transcripción Swi4 en el promotor de *FKS2* (Kim *et al.*, 2008).

Otro factor de transcripción fosforilado por Slt2 es el complejo SBF formado por las proteínas Swi4, subunidad de unión a DNA, y Swi6, la subunidad reguladora. Está principalmente implicado en la regulación del ciclo celular y del crecimiento polarizado. Este complejo es esencial para la regulación de la expresión de las ciclinas de fase G1 (Cln1, Cln2, Pcl1 y Pcl2) que se unen a Cdc28, permitiendo así la correcta transición de la fase G1 a la fase S y el crecimiento polarizado (Madden *et al.*, 1997). Aunque la función principal de SBF es la de dirigir la transcripción específica en la fase G1, se ha sugerido que Slt2 podría estar regulando este complejo en respuesta a estímulos que dañen la pared celular, a través de su unión a la subunidad Swi4 (Baetz *et al.*, 2001). La delección de *SWI4* provoca sensibilidad celular a altas temperaturas, un defecto remediable por estabilización osmótica, mientras que la sobreexpresión de *SWI4*, *PCL1* o *PCL2* suprime el defecto de crecimiento mostrado a 37°C por un mutante *slt2Δ*. Tanto Swi4 como Swi6 interaccionan con Slt2 y éste último es fosforilado por esta MAPK. Esto sugiere que SBF funciona por debajo de Slt2 en la ruta de integridad celular (Madden *et al.*, 1997).

Por último, se ha observado que Slt2 tiene capacidad activadora de la transcripción en respuesta a estrés de pared celular, siendo necesario para ello la fosforilación de la MAPK. Esta fosforilación controla la formación de interacciones intramoleculares que regulan la función de los dominios activadores de la transcripción identificados en Slt2 (Kim *et al.*, 2007).

3.4.1 Respuesta transcripcional regulada por la ruta de integridad celular

Cuando la pared celular de la levadura *S. cerevisiae* se ve afectada por la presencia de agentes que dañan su estructura o por mutaciones en genes que codifican enzimas que participan en su biogénesis, la célula pone en marcha una serie de mecanismos que le permiten reparar el daño generado para mantener así la funcionalidad de esta estructura fundamental. Es lo que se denomina mecanismo compensatorio (Popolo *et al.*, 1997). Este mecanismo está principalmente regulado por la ruta de integridad celular, de manera que tras detectar el daño correspondiente se produce la activación de la ruta y un aumento de la expresión de determinados genes dependientes de la MAPK Slt2 (Garcia *et al.*, 2004; Jung & Levin, 1999; Lagorce *et al.*, 2003).

En 1999, Jung y colaboradores realizaron un análisis transcriptómico de los genes cuya expresión se veía alterada en respuesta a la activación de esta ruta de integridad celular empleando una versión de Mkk1 constitutivamente activa. Así se identificaron 25 genes cuya expresión se regula por Rlm1, muchos de los cuales codifican proteínas estructurales de la pared celular y proteínas implicadas en su biogénesis, genes como *CWP1*, *CRH1*, *MLP1*, el propio *SLT2* y genes codificantes de proteínas tipo PIR (Jung & Levin, 1999). Sin embargo la inducción de *FKS2*, que codifica una de las subunidades de la glucan sintasa, es independiente de Rlm1.

La respuesta transcripcional de mutantes en proteínas de la pared celular o enzimas relacionadas con su biogénesis (*fks1Δ*, *gas1Δ*, *kre6Δ*, *mn9Δ* y *knr4Δ*) incluye un grupo común de genes cuya expresión se encuentra incrementada y que son característicos del mecanismo compensatorio. Entre ellos, aparecen genes implicados en la biogénesis de la pared celular como *GFA1*, *CHS3*, *CRH1*, *BGL2*, *SCW10*, *EXG1*, *PIR3* y *CWP1*, *SPI1* y *SED1* (Lagorce *et al.*, 2003). Estos mutantes no sólo muestran mayores niveles de fosforilación de Slt2 como consecuencia de la activación de la ruta de integridad celular, sino que también aumenta la expresión del gen *SLT2*. También aumenta la expresión de genes implicados en metabolismo, generación de energía y protección como chaperonas. En el mecanismo compensatorio desencadenado en estos mutantes analizados, además de poner de manifiesto la implicación de la ruta de integridad celular también se observó una importante participación de la ruta de la Calcineurina y de la respuesta mediada por el factor de transcripción Msn2/4, dado que muchos de los genes regulados presentan en sus secuencias promotoras sitios de unión a los factores de transcripción Rlm1 y Swi4, a Crz1 (factor de transcripción de la ruta de Calcineurina que responde a incrementos de calcio intracelular) y a Msn2/4 y Hsf1 (implicados en la respuesta a estrés y choque térmico) (Lagorce *et al.*, 2003).

El análisis global de la respuesta transcripcional ante daños en pared por agentes como el rojo Congo o la zimoliasa, muestra también inducción de un gran número de genes relacionados con la construcción de la pared celular y el metabolismo, así como el grupo de genes relacionados con la regulación de la ruta de integridad celular o ruta CWI. Así, además de mostrarse inducida la transcripción del gen *SLT2*, también aparece *MID2*, gen correspondiente a uno de los sensores de la misma, *PTP2* o *MSG5*, codificantes de proteínas fosfatasa implicadas en la regulación de esta ruta. También se induce la expresión de *RLM1*, gen codificante del factor responsable de la transcripción de múltiples genes de pared, sugiriendo así la existencia de mecanismo de autorregulación para amplificar la señal. De este grupo, cabe destacar la elevada inducción del gen *MLP1* (Garcia *et al.*, 2004). Estos genes contienen en sus promotores sitios de unión a factores de transcripción como Rlm1 (mayoritariamente), Crz1, SBF, Msn2/Msn4, Ste12 y Tec1, sugiriendo así la implicación de varias rutas de señalización en la respuesta a estos daños de pared. Principalmente la ruta de integridad celular regula esta respuesta a través de la activación transcripcional mediada por Rlm1 ya que los perfiles de expresión en ausencia de Slt2 o de Rlm1 son prácticamente similares, revelando una contribución semejante de estas proteínas a la regulación de esta respuesta celular.

En conjunto, analizando todos los datos transcritómicos de daño en pared, un grupo de 20 genes implicado en el remodelamiento de la pared celular en presencia de rojo Congo o zimoliasa (Garcia *et al.*, 2004) también se encuentra inducido en mutantes afectados en la pared celular en el estudio mencionado anteriormente (Lagorce *et al.*, 2003). Este grupo de genes representan la principal respuesta transcripcional ante estrés de pared celular, y engloba a genes de biogénesis de pared, de señalización, metabolismo, estrés, y algunos de

función desconocida. Muchos de estos genes también aparecen inducidos en análisis similares de células que portan alelos hiperactivos de componentes de la ruta de integridad celular como *PKC1*, *RHO1* (Roberts *et al.*, 2000) o *MKK1* (Jung & Levin, 1999), indicando así el papel tan importante que desempeña la ruta en esta respuesta.

García y colaboradores (2004) observaron que prácticamente la mitad de los genes de pared celular inducidos por rojo Congo y zimoliasa también encontraban incrementada su transcripción en células que sobreexpresaban el factor de transcripción Tec1 (Madhani *et al.*, 1999), así como tras tratamientos prolongados en presencia de feromona (Roberts *et al.*, 2000). Esto sugiere la existencia de niveles adicionales de regulación de la respuesta transcripcional a daño en pared a través de las rutas de pseudofilamentación y apareamiento.

Existen también evidencias que llevan a plantear la existencia de un entrecruzamiento entre las rutas mediadas por Hog1 y Slt2; por una parte la MAPK Hog1 regula la expresión de *SLT2* tras estrés osmótico, siendo el factor de transcripción Rlm1 el responsable de esta inducción transcripcional (Hahn & Thiele, 2002). Por otra parte, se ha demostrado que además de ser necesaria para la supervivencia en condiciones de estrés hiperosmótico, la ruta HOG está implicada en la adaptación a estrés de pared celular (Bermejo *et al.*, 2008). La inducción transcripcional en presencia de zimoliasa del gen *CRH1* (que codifica una proteína implicada en la remodelación de la pared celular responsable de la unión entre la quitina y el β -1,6 glucano) (Rodríguez-Pena *et al.*, 2000), requiere los elementos Sho1, Ste11, Ste50, Pbs2 y la MAP quinasa Hog1, lo cual sugiere que ambas rutas participan en la señalización de este daño. Sin embargo, la inducción transcripcional de *CRH1* está mediada íntegramente por el factor de transcripción Rlm1 regulado por Slt2, y no por los factores de transcripción regulados por la MAPK Hog1. Además, en relación a este entrecruzamiento, recientemente se han analizado los perfiles transcripcionales de mutantes de las MAPKs de ambas rutas en respuesta a zimoliasa; esto ha permitido caracterizar la conexión entre ambas cascadas y apoyar el modelo que defiende una activación secuencial de Hog1 y Slt2, y por tanto una participación conjunta para la adaptación a zimoliasa (García *et al.*, 2009). Incluso se ha sugerido un efecto inhibitorio de la ruta CWI sobre ruta HOG ya que, en presencia de zimoliasa, mutantes *slt2 Δ* muestran una respuesta alternativa a la observada en células silvestres, cuya activación de muchos de estos genes es inhibida por la doble interrupción *hog1 Δ slt2 Δ* , indicando con ello que esta activación depende de Hog1 (García *et al.*, 2009).

3.5. Ruta de esporulación

En condiciones de ausencia de nutrientes, las células diploides de *S. cerevisiae* sufren meiosis produciéndose como consecuencia cuatro núcleos haploides rodeados de una cubierta resistente a la desecación y al calor que constituyen las cuatro ascosporas incluidas en las ascas. La MAPK Smk1 participa en este proceso de esporulación, y es esencial en el proceso de formación de la pared celular de la espora, sin serlo para la división meiótica (Krisak *et al.*,

1994). Esta proteína sólo se expresa durante la esporulación. También la proteína quinasa Sps1 participa en el proceso de esporulación; de hecho, la delección sencilla de cada una de estas quinasas presenta fenotipos similares. No se han identificado los componentes del módulo de MAPKs que actúan por encima de la MAPK Smk1, aunque se ha propuesto que Sps1 podría actuar como activador de Smk1. Esta ruta regula la activación transcripcional de genes implicados en la construcción de la pared como *FKS2* y *CHS3* (Chen & Thorner, 2007).

4. REGULACIÓN NEGATIVA DE LAS RUTAS DE MAPKS POR PROTEÍN FOSFATASAS

Queda patente la importancia de la activación de las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs para la adaptación a los cambios que se producen en el medio; sin embargo, si la activación se prolonga durante más tiempo del necesario, puede llegar a resultar perjudicial. Por ello, es tan importante una modulación muy precisa tanto de la duración como de la intensidad de la respuesta generada por las rutas de MAPKs. La desfosforilación e inactivación de las MAPKs ejercida por las proteínas fosfatasa es una de las formas más directas de controlar ambos parámetros.

La fosforilación de los dos residuos de treonina y tirosina presentes en el dominio de activación de estas quinasas es necesaria para que éstas se encuentren activas; sin embargo, la desfosforilación de tan sólo uno de estos residuos es suficiente para conseguir la inactivación de las MAPKs (Marshall, 1995). Esta función es llevada a cabo por proteínas fosfatasa que actúan sobre las MAPKs, jugando así un papel crucial en la regulación negativa de la señalización de estas rutas de transducción de señales.

Entre las proteínas fosfatasa capaces de actuar sobre MAPKs se distinguen las fosfatasa de serinas/treoninas (PPs, *protein phosphatases*), las fosfatasa de tirosinas (PTPs, *protein tyrosin phosphatases*) y dentro de las fosfatasa de especificidad dual (DUSPs, *dual specificity protein phosphatases*), las MKPs (*MAPK phosphatases*), capaces de desfosforilar tanto residuos de tirosina como de treonina/serina de las MAPKs, inicialmente clasificadas dentro de las PTPs. Diversos trabajos usando una amplia variedad de organismos modelo han demostrado que estas tres clases de fosfatasa pueden regular a las MAPKs *in vivo* (Keyse, 2000; Patterson *et al.*, 2009). En mamíferos, un importante punto de control de la señalización mediada por MAPKs está ejercido por la expresión y la actividad diferencial de las fosfatasa de especificidad dual (Owens & Keyse, 2007).

5. PROTEÍN FOSFATASAS DE MAPKS EN MAMÍFEROS

5.1. Fosfatasa de serinas/treoninas

Las serín treonín fosfatasa (PPs) se caracterizan por su capacidad para eliminar grupos fosfatos de los residuos Ser/Thr en sus sustratos. Están constituidas por la familia de las PPP que es la más amplia (PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 y PP7), por la familia PPM (dependientes de Mg^{2+} o Mn^{2+}) en la que destacan las proteínas fosfatasa PP2C, y la familia FCP, cuyos miembros sólo pueden desfosforilar el dominio carboxi-terminal de la RNA polimerasa II (Cohen, P.T.W., 2004). De todas ellas, las fosfatasa implicadas hasta el momento en la

inactivación de las vías de señalización de las MAPKs son PP2A y PP2C. Ambas enzimas son principalmente citosólicas y se expresan de manera constitutiva en la célula.

Gran cantidad de trabajos involucran a la fosfatasa PP2A en funciones relacionadas con la regulación del metabolismo celular, replicación del DNA, procesamiento del RNA, traducción, progresión de ciclo celular, morfogénesis, desarrollo y transformación, así como regulación de una gran cantidad de proteínas quinasas (Saxena & Mustelin, 2000). Se trata de una proteína heterotrimérica compuesta por una subunidad que actúa como *scaffold* y una subunidad catalítica (PP2Ac) que se asocia con una gran variedad de subunidades regulatorias que modulan su actividad, especificidad de sustrato y localización subcelular (Janssens & Goris, 2001). Varios mecanismos como los relativos a la composición de la holoenzima, la metilación y fosforilación de la subunidad catalítica, pueden regular su actividad (Longin *et al.*, 2007). La actividad de PP2A es inhibida por una gran variedad de toxinas naturales como el ácido oxálico (OA), por la calcineurina A, así como por varias proteínas virales. Dependiendo de su composición, diferentes trímeros de PP2A pueden regular negativamente la actividad de las distintas rutas de MAPKs. Así, numerosas observaciones sugieren un importante papel de PP2A en la regulación negativa de la ruta de las MAPKs tipo ERK y JNK. *In vitro*, PP2A puede desfosforilar e inactivar tanto MEK1/2 como ERK1/2. También existen evidencias *in vivo* de la regulación negativa de MEK1/2 por PP2A (Kins *et al.*, 2003). Recientemente se ha mostrado que PP2A también regula la ruta de p38 gracias a su acción sobre el activador de la MAPK p38, MKK3 (Prickett & Brautigan, 2007).

Sin embargo, las proteínas fosfatasas PP2C parecen ser reguladores negativos de las MAPKs p38 y JNK más importantes que las PP2A. Se trata de enzimas monoméricas que se encuentran tanto en organismos eucariotas como en procariotas. Recientes estudios realizados en mamíferos revelan que existen al menos 18 miembros de esta familia (Lu & Wang, 2008). A diferencia de PP2A, no les afecta la presencia de ácido oxálico o de toxinas inhibitorias de la familia de las PPPs. Se ha demostrado que ciertas isoformas de PP2C participan en revertir la activación de rutas de MAPKs activadas tras estrés. PP2C α inhibe la activación de p38 y JNK, pero no afecta a la activación inducida de ERK; PP2C α desfosforila e inactiva MKK6, MKK4 y p38 *in vivo* e *in vitro*, pero no tiene efecto sobre MKK1. También se ha visto que la sobreexpresión de PP2C α y PP2C β en células transfectadas es capaz de suprimir la activación de la señalización mediada por p38 y JNK inducida por anisomicina y NaCl a través de la desfosforilación directa de MKK3, MKK4, MKK6 y MKK7 (Hanada *et al.*, 1998). Además, estudios más recientes revelan que ambas fosfatasas existen en el mismo complejo proteico con p38, poniendo de manifiesto así la importancia de PP2C α y PP2C β en la regulación de la señalización por MAPKs (Vahebi *et al.*, 2007). También, miembros de esta familia regulan la activación de estas cascadas de señalización por actuar sobre las MAPKKKs. En definitiva, PP2C α , PP2C β y PP2C ϵ regulan la transducción de señales por MAPKs a través de la interacción directa o indirecta con distintos componentes de estas rutas, y parecen tener un papel específico en la respuesta a estrés para

regular la muerte celular y la supervivencia (Lu & Wang, 2008). Adicionalmente, en un *screening* en búsqueda de reguladores negativos de la actividad de la ruta ERK ha sido identificada otra fosfatasa de la familia PP2C, PPM1 α como un nuevo inhibidor de la activación de las MAPK tipo ERK en *Drosophila* (Friedman & Perrimon, 2006).

5.2. Fosfatasas de tirosinas (PTPs)

Es necesario que exista un balance entre la regulación ejercida por las PTPs y las proteínas tirosín quinasas para que se produzca una señalización correcta a través de las rutas de transducción de señales. Por ello, anomalías en estos procesos de fosforilación/desfosforilación se relacionan con patogénesis de numerosas enfermedades como el cáncer, diabetes o enfermedades de tipo autoinmune; así se ha descrito en varias ocasiones la implicación de las PTPs en enfermedades humanas (Alonso *et al.*, 2004).

Dentro de esta superfamilia se incluye la subfamilia PTP de tirosín fosfatasas de tipo I basadas en cisteína. Dentro de esta subfamilia se engloban tanto las PTPs clásicas (tirosín fosfatasas) que desfosforilan residuos de tirosina, como las fosfatasas duales o DUSPs (*Dual Specificity Phosphatases*), dentro de las cuales se encuentran las MKPs (*MAP Kinase phosphatases*), capaces de desfosforilar también serinas y treoninas y a las que con frecuencia se las considera como un grupo independiente (Patterson *et al.*, 2009). Las enzimas clásicas, a las cuales nos referiremos en este apartado, se subclasifican a su vez en proteínas transmembrana de tipo receptor (RPTP) y no transmembrana (*non*-TM) (Tonks & Neel, 2001).

5.2.1. Visión general de PTPs clásicas

Los miembros de esta familia de tirosín fosfatasas mantienen una organización modular. Además del dominio catalítico que posee un alto grado de conservación, poseen regiones que juegan un papel fundamental en la localización subcelular, en la regulación de la actividad enzimática o en el reclutamiento de ligandos específicos (Alonso *et al.*, 2004).

Las PTPs se caracterizan por presentar en su centro catalítico la secuencia "HCXXGXXR", también presente en las fosfatasas de especificidad dual (DUSPs), con las que además comparten el mecanismo catalítico para la hidrólisis del sustrato. El residuo de cisteína presente en el mencionado motivo es el responsable del ataque nucleofílico que sufrirá el sustrato de estas fosfatasas; además, un residuo de aspártico juega un papel importante en el proceso, ya que también es necesaria su presencia para la formación del intermediario tipo cistenil fosfato mediante un proceso de protonación, así como para su posterior hidrólisis. La sustitución del aspártico por alanina reduce la actividad catalítica, mientras que la sustitución del residuo de cisteína por alanina provoca la pérdida completa de la actividad enzimática de la fosfatasa (revisado por Tabernero y colaboradores, 2008).

Las PTPs clásicas contienen uno o dos dominios fosfatasa conservados ("dominios PTP") de unos 280 aminoácidos. Estudios estructurales muestran que el centro activo de estas

enzimas es una hendidura en la superficie de la molécula, cuya gran profundidad determina la especificidad exclusiva hacia residuos de fosfotirosina y no frente a los de fosfoserina o fosfotreonina (que son demasiado cortos). En su región amino-terminal y fuera de la zona catalítica se ha identificado un motivo de unos 16 aminoácidos identificado también en otras proteínas que interaccionan con MAPKs. Se trata del dominio *KIM* (*Kinase Interaction Motif*) (Pulido *et al.*, 1998). Tal y como se verá posteriormente, la interacción mediada por este motivo y un dominio común de las MAPKs no sólo está implicada en controlar la función de la MAPK sino también su localización celular.

Otra característica a destacar está relacionada con el cambio conformacional que adoptan éstas proteínas tras la unión a sustrato. En ausencia de sustrato, el sitio activo adopta una conformación abierta en la cual el residuo ácido de aspártico está situado lejos del sitio activo, excluyéndolo de servir como donador de protones. Sin embargo, tras la unión del sustrato, el sitio activo se cierra rodeando a la cadena de fosfotirosina del sustrato, de manera que este cambio conformacional reposiciona el aspártico para ejercer su función catalítica (Tonks & Neel, 2001).

Las PTPs también se caracterizan por no necesitar un ión metálico para su catálisis, por su capacidad para hidrolizar al sustrato artificial p-nitrofenilfosfato y por su sensibilidad al vanadato e insensibilidad al ácido okadáico, reactivos comúnmente usados como inhibidores de fosfatasa de proteínas.

5.2.2. PTPs que regulan MAPKs

Tres tirosín fosfatasas, STEP (*Striatal enriched phosphatase*), PTP-SL (*STEP-like phosphatase*, PTP-RR), y HePTP (*Hematopoietic Phosphatases*), han emergido como importantes reguladores de las funciones de MAPKs en mamíferos. Las dos primeras se expresan principalmente en células neuronales y se han identificado distintas isoformas debido a procesamiento alternativo del RNAmensajero, al uso alternativo de promotores de la transcripción, o al uso alternativo del codón de inicio de la traducción (Chirivi *et al.*, 2004). Se localizan tanto en el citoplasma como en la membrana (Camps *et al.*, 2000). La HePTP es una fosfatasa citosólica que se encuentran principalmente en células hematopoyéticas. Se trata de tres tirosín fosfatasas estructural y funcionalmente muy relacionadas entre sí (revisado por Tabernero y colaboradores, 2008).

5.2.3. Mecanismos de reconocimiento de sustrato y regulación catalítica

Los dominios catalíticos de las PTPs a menudo presentan especificidades de sustrato *in vitro* amplias, aunque *in vivo*, las fosfatasas exhiben especificidades más limitadas. Esto es debido en parte a la presencia adicional de dominios regulatorios que dirigen la localización y las interacciones de estas proteínas con sustratos específicos (Tabernero *et al.*, 2008).

Cuando STEP y PTP-SL se unen a ERK1/2, se suceden dos hechos; por una parte, la región no catalítica amino-terminal de estas fosfatasas es fosforilada por ERK1/2 y, por otra

parte, la MAPK es desfosforilada e inactivada específicamente en el residuo de tirosina presente en su dominio de activación (Zuniga *et al.*, 1999). Otras MAPKs que han mostrado asociación física y funcional con PTP-SL son p38 α y ERK5 (Buschbeck *et al.*, 2002).

HePTP es otra PTP cuya estructura está formada por un dominio catalítico C-terminal convencional y una pequeña región N-terminal. Regula negativamente tanto a ERK1 /2 como a p38 (Mustelin *et al.*, 2005), mientras que es incapaz de unirse e inhibir la actividad JNK. HePTP regula la actividad de estas quinasas de dos maneras; primero, HePTP desfosforila el residuo de fosfotirosina presente en el dominio de activación de las MAPKs, inactivándolas; por otra parte secuestra a la quinasa y forma con ella un complejo estable que evita su translocación al núcleo (Mustelin *et al.*, 2005).

5.3. Fosfatasas de especificidad dual (MKPs)

5.3.1. Visión general de las fosfatasas de especificidad dual (MKPs)

El primer tipo de fosfatasas que mostró especificidad hacia las MAPKs fue el de las fosfatasas de especificidad dual (DUSP), siendo la proteína VH1 procedente del virus vaccinia (Guan *et al.*, 1991) la primera fosfatasa de especificidad dual descrita capaz de desfosforilar residuos de fosfotirosina y de fosfoserina/treonina en mamíferos. La proteína VH1 no contiene una secuencia homóloga a la de la familia de tirosín fosfatasas excepto la zona que codifica para el sitio activo. Posteriormente fueron clonados tanto su homólogo en mamíferos, VHR (que carece de la región amino-terminal identificada luego en otros genes DUSP), así como varias proteínas pertenecientes a la familia de las MKPs (*MAPKinase phosphatases*). Si bien VHR regula negativamente las MAPKs ERK1/2 y JNK, la gran mayoría de las MKPs son capaces de desfosforilar los tres tipos de MAP quinasas, aunque con distinto orden de preferencia (Kondoh & Nishida, 2007).

Este grupo de fosfatasas tiene un papel muy destacado en la regulación de la señalización por MAPKs. En concreto, son 10 las fosfatasas de especificidad dual que actúan desfosforilando e inactivando MAPKs en mamíferos. La mayoría de las MKPs, a diferencia de las PPs, cuya expresión es constitutiva, son codificadas por genes de expresión regulada que son transcripcionalmente inducidos tras la activación de la MAPK, formando parte así del mecanismo de regulación negativo ejercido sobre estas quinasas. Además, una misma fosfatasa es capaz de regular varias MAPKs (Owens & Keyse, 2007). Se sabe que la desregulación de la señalización a través de estas rutas es la alteración más común en cánceres humanos. Estudios recientes sugieren que las MKPs juegan un papel muy importante no sólo en el desarrollo del cáncer sino también en la respuesta de las células cancerígenas a la quimioterapia (Wu, 2007).

Como mencionamos previamente, PTPs y DUSPs comparten el motivo HC(X)₅R en el centro activo y poseen un mismo mecanismo de hidrólisis; sin embargo, las DUSPs presentan una hendidura de unión al fosfato del sustrato más profundo del que exhiben el resto de las

PTPs, situación que favorece la acomodación de aminoácidos fosforilados tanto de serina/treonina como de tirosina, de mayor longitud (revisado por Patterson, 2009).

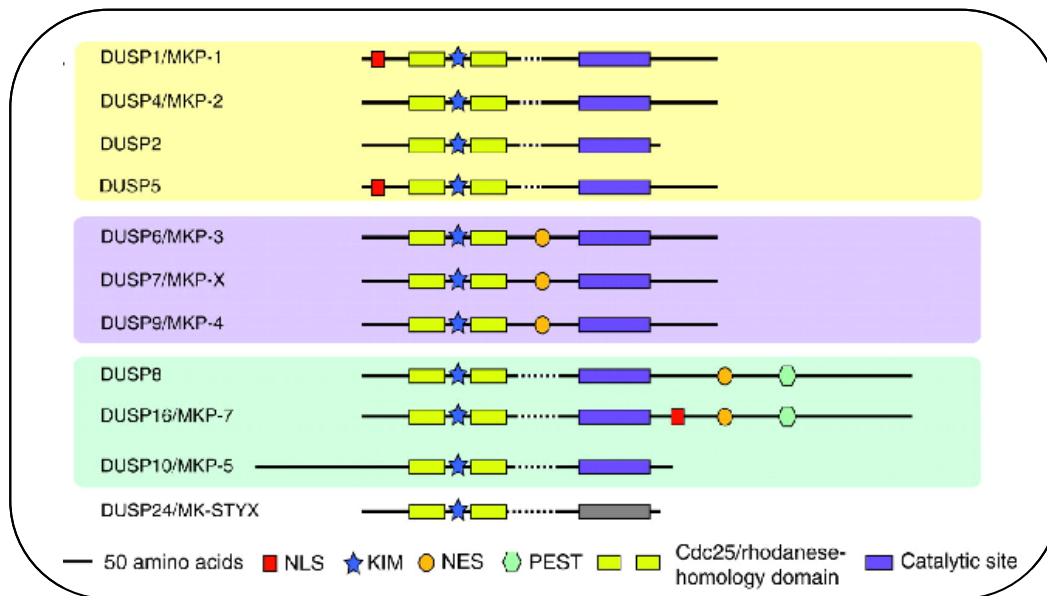


Figura 7. Clasificación y estructura de los dominios presentes en las MKPs. Reproducido de Dickinson y Keyse (2006).

Las MKPs comparten una estructura común compuesta por dos dominios (**figura 7**), el dominio fosfatasa de especificidad dual (DUSP) en la región carboxi-terminal en el que se localiza el centro catalítico en el que la cisteína es clave para el ataque nucleofílico dirigido al fosfato del sustrato, y el dominio de unión a MAPKs (MKB) en la zona amino-terminal de la proteína, menos conservado que el dominio catalítico, responsable de regular la especificidad enzimática a través de las interacciones con las MAPKs (Dickinson & Keyse, 2006). Este dominio contiene en su secuencia dos regiones situadas por delante del centro activo y que muestran similitud con el dominio catalítico de la fosfatasa Cdc25, denominados motivos CH₂. Además el dominio MKB contiene un grupo de aminoácidos cargados positivamente en un entorno hidrofóbico que determinan la especificidad de unión de las MKPs hacia las MAPKs. Es el denominado dominio *docking* o *D* (similar al dominio *KIM* de PTPs), responsable de la unión al dominio CD (*Common Docking*) presente en las MAPKs. La unión de la MAPK fosforilada al dominio MKB de la fosfatasa altera la estructura del dominio, y se producen así cambios conformacionales que incrementan la actividad catalítica de las MKPs (Keyse, 2008; Kondoh & Nishida, 2007). Se han identificado dominios adicionales a éstos, importantes para la interacción y la activación de las MAPKs por MKPs y que se explicarán con más detalle en el apartado de interacciones de MAPKs.

También se han identificado en algunas proteínas que con frecuencia se degradan rápidamente, secuencias PEST abundantes en residuos de prolina, serina, treonina y glutámico.

Su presencia acelera la degradación de la fosfatasa, ya que se ha visto que cuando la proteína carece de ellas, se produce una estabilización de su efecto.

5.3.2. Clasificación

Las MKPs se diferencian según la especificidad que muestran hacia los miembros de la familia de las MAPKs, su distribución tisular, su localización subcelular y su patrón de expresión (inducible o constitutivo) por estímulos extracelulares. Estos criterios permiten que existan distintas formas de clasificarlas, y es por ello que no existe una clasificación única de estas fosfatasas de especificidad dual. Así, en función de la secuencia génica, la estructura proteica, la especificidad de sustrato y la localización subcelular, la familia de las MKPs puede dividirse en tres subgrupos, indicándose en la tabla 1 las características fundamentales de cada una de ellas (Kondoh & Nishida, 2007).

Tabla 1. Clasificación, nomenclatura, propiedades claves y funciones fisiológicas de las fosfatasas de especificidad dual de mamíferos (MKPs) (Keyse, 2008).

TIPO	Nombre	Otro nombre	DUSP	Especificidad	Localización	Relevancia fisiológica
				MAPK	subcelular	
I	MKP-1	CL100, 3CH134, Erp, hVH1	DUSP1	p38,JNK>ERK1/2	Nuclear	Regulador negativo de la respuesta inmune Protege a ratones del shock endotóxico mortal Juega un papel clave en la homeostasis metabólica y media resistencia a estrés celular en fibroblastos de ratón
	PAC1		DUSP2	ERK1/2>p38,JNK	Nuclear	Regulador positivo de la respuesta inflamatoria. Ratones <i>Knockout</i> son resistentes a la inflamación inmune
	MKP-2	hVH2, TYP2, STY8	DUSP4	ERK1/2,JNK	Nuclear	
II	hVH3	B23	DUSP5	ERK1/2	Nuclear	Desconocida
	MKP-3	Pyst1, rVH6	DUSP6	ERK1/2, ERK5	Citoplasmática	Regulador del negativo de la actividad de ERK2 en respuesta a FGF (<i>fibroblast growth factors</i>)
	MKP-X	Pyst2, B59	DUSP7	ERK1/2>JNK	Citoplasmática	
	MKP-4	Pyst3	DUSP9	ERK1/2>p38	Citoplasmática	Esencial para el desarrollo y función placentaria
III	MKP-5		DUSP10	JNK, p38	Nuclear/Citoplasmática	Funciones en la inmunidad innata y adaptativa
	MKP-7			JNK, p38	Nuclear/Citoplasmática	

Las MKP tipo I engloba a fosfatasa de localización nuclear cuya expresión es inducida por muchos de los estímulos que activan a las MAPKs. Las fosfatasa de este grupo constan de unos 300 o 400 residuos aminoácidos y contienen una secuencia de localización nuclear (NLS) en su zona N- terminal (**figura 7**).

Sin embargo, las MKPs de tipo II, también llamadas subfamilia Pyst de las fosfatasa de especificidad dual, poseen una señal de exportación nuclear (NES) y se localizan en el citoplasma. Estas fosfatasa muestran una distribución tisular restringida y preferentemente inactivan ERK1 y ERK2.

Y por último, las MKPs tipo III selectivamente desfosforilan las MAPKs activadas por estrés, JNK y p38. Aunque estas fosfatasa son demasiado grandes para entrar en el núcleo por difusión pasiva, se encuentran distribuidas tanto por el citoplasma como por el núcleo. Este tipo de fosfatasa contienen secuencias PEST encargadas de hacer que la proteína deje de actuar con rapidez (Theodosiou & Ashworth, 2002).

5.3.3. Mecanismos de reconocimiento de sustrato y activación catalítica

La primera MKP que mostró especificidad de sustrato frente a un tipo de MAPK fue MKP3, ya que inactivó ERK1/2 *in vitro* e *in vivo* mientras que no mostró apenas actividad hacia JNK o p38 (Groom *et al.*, 1996). También otras MKPs exhiben esta selectividad hacia determinadas MAPKs, como es el caso de MKP5 y MKP7, que inactivan selectivamente JNK y p38. Al mismo tiempo también existen otras, como MKP1, capaces de regular todos los tipos de MAPKs (Muda *et al.*, 1996).

Se ha observado en muchos de estos casos como, tras el reconocimiento y la unión de la MAPK a la MKP, se produce un incremento en la actividad catalítica de esta fosfatasa, proponiéndose así un mecanismo general de regulación de la actividad catalítica de las MKPs. Tanto la unión como la activación de la MKP son independientes de la actividad de la proteína quinasa (Camps *et al.*, 2000). Así, el reconocimiento de ERK2 por MKP3 incrementa la capacidad catalítica de esta fosfatasa *in vitro* e *in vivo*; también MKP1, MKP2, MKPX y MKP4 incrementan su actividad tras unirse a sus correspondientes sustratos.

La determinación de la estructura cristalina del dominio catalítico de MKP-3 en ausencia de sustrato ayuda a comprender el incremento de actividad de la fosfatasa derivada de su unión con la MAPK (Stewart *et al.*, 1999). En situación en la que la fosfatasa es inactiva, los residuos catalíticos claves muestran una geometría distorsionada, de manera que la conformación de la proteína es más abierta y el residuo de aspártico que juega un papel fundamental en el proceso catalítico, se encuentra desplazado del centro activo de la proteína. Sólo cuando la MAPK correspondiente se une a la fosfatasa, se produce una reorganización del centro activo, quedando más cerrado y permitiendo así al aspártico adoptar la posición óptima para que se de la catálisis. A diferencia de lo observado en MKP3, ni la fosfatasa MKP5 ni DUSP5 aumentan su activación catalítica tras la unión a sus sustratos fisiológicos, de manera

que en ambas conformaciones el entorno en el que se encuentra el residuo ácido tiene la configuración óptima para la catálisis (Jeong *et al.*, 2006).

6. PROTEÍN FOSFATASAS DE MAPKS EN LEVADURAS

Estudios bioquímicos y genéticos en la levadura modelo *S. cerevisiae* han permitido ampliar el conocimiento de los aspectos claves de la regulación negativa sobre MAPKs, ya que existe una notable conservación de los componentes y de los mecanismos moleculares que participan en el proceso (Martin *et al.*, 2005).

6.1. Proteín fosfatasas de serinas/treoninas

En la familia de serín-treonín fosfatasas de tipo 2C (PP2C) en levadura, Ptc1, Ptc2 y Ptc3, han sido identificados como reguladores negativos de MAPKs, en concreto de la ruta mediada por la MAPK Hog1 (Warmka *et al.*, 2001). Las tres fosfatasas actúan como supresores en multicopia de la letalidad en un mutante *snl1Δ* que, al carecer de este osmosensor, presenta una hiperactivación de los elementos de la cascada de Hog1 (Maeda *et al.*, 1994).

La sobreexpresión de *PTC1* inhibe la activación de Hog1 inducida en condiciones de estrés osmótico mientras que su delección eleva la actividad basal de Hog1 y bloquea su inactivación durante el proceso de adaptación. El mantenimiento de niveles bajos de actividad de Hog1 es clave para su rápida inducción tras la estimulación; por tanto, la delección de *PTC1* también conlleva un retraso en la activación de la ruta HOG. Sin embargo, no ejerce ningún efecto sobre la MAPKK Pbs2 *in vivo* (Warmka *et al.*, 2001).

Ptc2 y Ptc3 actúan conjuntamente limitando la activación máxima de Hog1. Son idénticas en un 75% y tienen funciones similares, que difieren de las realizadas por Ptc1, quizá por la presencia en estas dos proteínas de un dominio no catalítico en la región carboxilo terminal de unos 170 residuos aminoacídicos, ausente en Ptc1. Así se ha observado que la delección de *PTC2* y *PTC3* no altera la actividad de Hog1 en situación basal o en períodos de adaptación, aunque sí induce una hiperactivación de Hog1 tras estrés osmótico. Asimismo, la sobreexpresión de ambas conduce a la inhibición de la actividad de Hog1 en condiciones de estrés osmótico.

Por tanto, Ptc2 y Ptc3 limitan la activación máxima de Hog1 mientras que Ptc1 regula los niveles de activación basal de Hog1 y su inactivación durante la adaptación al estrés osmótico. Las tres PTCs actúan así de forma complementaria en la regulación de la MAPK Hog1. Otro aspecto a destacar es que la localización subcelular de estas tres PTCs no cambia en respuesta al estímulo, localizándose tanto en núcleo como en citoplasma (Young *et al.*, 2002).

Estudios globales de interacción entre proteínas en *S. cerevisiae* utilizando el sistema de dos híbridos identificaron a Nbp2 (*Nap-1 binding protein*) como una proteína de unión a Ptc1. Además, Nbp2 se une a través del dominio SH3 a la MAPKK de Hog1, Pbs2, actuando así como

proteína adaptadora de Ptc1 al complejo Pbs2-Hog1 donde ya puede ejercer su actividad fosfatasa sobre Hog1 (Mapes & Ota, 2004).

También existen estudios que relacionan a Ptc1 con la ruta de integridad celular, ya que se ha observado en un fondo genético determinado, que la delección de *PTC1* en combinación con una mutación en *SLT2* es letal para la levadura (Huang & Symington, 1995). Más recientemente se ha observado que tanto Ptc1 como Nbp2 son necesarias para el transporte de los túbulos del retículo endoplasmático a la periferia de las células hijas, y que la pérdida de ambas proteínas provoca un aumento en los niveles de fosforilación de la MAPK Slt2 (Du *et al.*, 2006). Adicionalmente, la mutación de *PTC1* produce un aumento de la expresión de numerosos genes que se inducen por daño en pared como *YKL161*, *SED1* o *CRH1*, lo que indica que la falta de esta fosfatasa activa la ruta de integridad celular mediada por Slt2 (Gonzalez *et al.*, 2006).

6.2. Proteín fosfatasas de tirosinas

Sólo dos proteínas de las tirosín fosfatasas PTPs clásicas, Ptp2 y Ptp3, han mostrado actividad sobre las MAPKs en levadura. Estas PTPs regulan la actividad de las MAPKs Hog1, Fus3 y Slt2, mostrando distinta afinidad por cada una de ellas. Así, Ptp2 regula principalmente las MAPKs Hog1 y Slt2, mientras que Ptp3 manifiesta mayor actividad sobre Fus3 (Martin *et al.*, 2005).

6.2.1. Actividad PTP sobre la MAPK Hog1

PTP2 y *PTP3* se aislaron como supresores en multicopia del defecto de crecimiento mostrado por el mutante *sln1Δ* debido a una hiperactivación de la ruta HOG. Ambas fosfatasas regulan Hog1 en condiciones basales y también participan en el proceso de adaptación, siendo Ptp2 la que ejerce un papel más relevante en el mantenimiento de un bajo nivel basal de fosforilación de Hog1. De hecho, la interrupción de *PTP2* (y no de *PTP3*) conduce a una fosforilación constitutiva de Hog1 incluso en ausencia de alta osmolaridad (Wurgler-Murphy *et al.*, 1997). Asimismo, los niveles de ambas proteínas aumentan de forma dependiente de Hog1 en respuesta a estrés osmótico (Jacoby *et al.*, 1997).

Diferencias en la afinidad y en la localización de ambas fosfatasas podrían explicar la distinta actividad. Ptp2 es una fosfatasa de localización nuclear que se une a Hog1 con mayor eficiencia que Ptp3, la cual tiene localización citoplásmica. Ya que Hog1 se acumula en el núcleo tras su activación, la localización nuclear Ptp2 podría favorecer su actuación sobre esta MAPK. Además de regular la actividad de Hog1, Ptp2 también parecen determinar la localización subcelular de esta MAPK, ya que actúa como anclaje nuclear de Hog1, mientras que Ptp3 es necesaria para su retención en el citoplasma (Mattison & Ota, 2000). Por tanto, ambas fosfatasas actúan reteniendo a la MAPK en sus respectivos compartimentos.

Hog1 también se activa tras estrés térmico y ambas fosfatasa son esenciales para la supervivencia celular a altas temperaturas, ya que evitan la hiperactivación de Hog1, que conduce a letalidad. Además, se ha sugerido que desempeñan importantes papeles en el mantenimiento de la especificidad de la señalización, ya que evitan el inapropiado entrecruzamiento de señales entre la ruta HOG y la ruta de integridad celular, en la que estas fosfatasa también participan. Así, el alelo hiperactivo de la MAPKK que opera en la ruta de integridad celular, *MKK1³⁸⁶*, es letal de manera dependiente de Hog1 sólo en ausencia de Ptp2 y Ptp3, situación en la que Hog1 esta hiperactivo. Por tanto, la delección de estas fosfatasa dejaría a la MAPK Hog1 susceptible de activación por otras rutas estimuladas por estrés, como la ruta de integridad celular (Winkler *et al.*, 2002).

6.2.2. Actividad PTP sobre la MAPK Fus3

También Ptp2 y Ptp3 actúan sobre la MAPK Fus3 de la ruta de apareamiento. En este caso, Ptp3 es más efectivo como regulador negativo sobre Fus3 que Ptp2. *PTP3* se aisló como supresor en multicopia del fenotipo causado por la activación constitutiva de la ruta de apareamiento debido a la presencia del alelo dominante *STE11-4* (Zhan *et al.*, 1997). Varios experimentos demuestran esta regulación; la sobreexpresión de *PTP3* reprime la transcripción regulada por Fus3 inducida por la presencia de feromona y promueve la adaptación; la ausencia de Ptp3, sólo o en combinación con la de Ptp2, induce una fosforilación constitutiva de Fus3 en condiciones basales y también en condiciones de estimulación con feromona; estos mutantes tienen aumentada de esta forma la actividad quinasa de Fus3 tras estimulación de la ruta y un retraso en el proceso de recuperación de la parada de ciclo que se induce en estas condiciones (Zhan *et al.*, 1997).

Estos datos indican que Ptp3 se requiere para mantener una actividad basal de la MAPK Fus3, y para el proceso de adaptación (Zhan *et al.*, 1997). Para ello, Ptp3 interacciona directamente con esta MAPK a través de sus dos dominios conservados de tipo CH₂ presentes en la región amino-terminal de esta fosfatasa; asimismo también es necesaria la presencia de un dominio *docking* formado por tres residuos básicos adyacentes a los dominios CH₂. Además se ha identificado en la MAPK Fus3 un residuo de aspártico (D317) conservado en el *common docking* (CD) de las MAPKs que establece la interacción con Ptp3 (Zhan & Guan, 1999).

6.2.3. Actividad PTP sobre la MAPK Slt2

Al igual que Hog1 y Fus3, la MAPK de la ruta de integridad celular Slt2, también está regulada por las tirosín fosfatasa Ptp2 y Ptp3, siendo Ptp2 la que desempeña un papel más destacado en su modulación. Varios hechos podrían explicar las diferencias en la actividad de estas fosfatasa frente a Slt2; la localización nuclear de Ptp2, al contrario que Ptp3, que es citoplasmática, puede favorecer la desfosforilación de Slt2, ya que una fracción de Slt2 activado se acumula en el núcleo. Además, tras choque térmico, aumenta la inducción transcripcional de *PTP2* bajo el control del factor de transcripción Rlm1, lo cual también favorece la actuación de

esta proteína tras la activación de la ruta mediada por la MAPK Slt2. Y por último, Ptp2 se une a Slt2 con mayor afinidad que Ptp3 (Mattison *et al.*, 1999).

Así se ha observado que la expresión en multicopia de *PTP2*, pero no de *PTP3*, es capaz de suprimir los defectos que provocan la expresión de los alelos hiperactivos de la MEKK de la ruta (*BCK1-20*) o de la MEK (*MKK1-386*). De acuerdo con esto, tan sólo la delección de *PTP2* incrementa los defectos de crecimiento debidos a la hiperactivación de *MKK1-386*. Sin embargo, la expresión de *MKK1-386* es letal en un doble mutante *ptp2Δptp3Δ* pero no en los sencillos, lo cual pone de manifiesto la participación de Ptp3 en esta regulación (Mattison *et al.*, 1999).

Ambas fosfatasa por una parte participan en el mantenimiento de un nivel bajo de actividad de Slt2, ya que en el doble mutante *ptp2Δptp3Δ*, y no en los mutantes individuales, aumentan los niveles basales de fosfotirosina de Slt2. Por otra parte, intervienen en condiciones de activación de la MAPK, ya que por ejemplo, tras choque térmico, tanto el doble mutante como los mutantes individuales muestran mayores niveles de fosfo-Slt2 que la cepa silvestre. Es más, estos niveles de fosforilación de Slt2 se mantienen tras desaparecer el estímulo, lo cual indica que Ptp2, y en menor medida Ptp3 son también necesarias para la adaptación tras choque térmico que estos autores han detectado (Mattison *et al.*, 1999). Sugieren así, que el aumento transcripcional de *PTP2* tras choque térmico podría ser necesario para la inactivación de Slt2 en el proceso de adaptación observado en un fondo genético determinado.

Por tanto, Ptp2 y Ptp3 son reguladores generales de la señalización a través de MAPKs, siendo capaces de inactivar las rutas de señalización mediadas por Hog1, Fus3 y Slt2 pero mostrando diferencias en la especificidad y en el momento de actuación sobre las distintas MAPKs.

6.3. Fosfatasa de especificidad dual

6.3.1. Sdp1

Sdp1 (*stress-inducible dual specificity phosphatase*) es una proteína que inicialmente mostró interacción con la MAPK Slt2 en un análisis global de interacciones entre proteínas de *S. cerevisiae* mediante el sistema de dos híbridos (Uetz *et al.*, 2000). Codificada por el gen *YIL113w*, Sdp1 es una pequeña proteína fosfatasa de 209 aminoácidos que contiene en su secuencia el dominio conservado del sitio activo de las PTPs. Sin embargo carece del dominio amino-terminal regulatorio característico de las MKPs.

Sdp1 es capaz de desfosforilar los residuos de tirosina y treonina de la forma activa de ERK2 *in vitro*, de ahí que se considere como una fosfatasa de especificidad dual. Sdp1 interacciona específicamente con la MAPK Slt2 y la inactiva tanto *in vivo*, en condiciones de estrés térmico, como *in vitro*. Sin embargo, esta fosfatasa no está implicada en la regulación de la MAPK Fus3, ya que el mutante *sdp1Δ* presenta un comportamiento normal en presencia de feromona. Asimismo, este mutante sencillo, o en combinación con *ptp2Δ* y/o *msg5Δ*, no tiene efecto sobre los niveles de fosforilación de la MAPK Hog1, indicando que tampoco está

involucrado en regular la respuesta celular ante condiciones de estrés osmótico. Este resultado indica que, a diferencia de lo que ocurre con las PTPs y con otra fosfatasa de especificidad dual de la que hablaremos a continuación, Msg5, Sdp1 muestra una alta afinidad exclusiva por Slt2 (Collister *et al.*, 2002).

Por tanto, Sdp1 regula negativamente a la MAPK de la ruta de integridad celular Slt2 por desfosforilación directa en situaciones de activación de la ruta de integridad celular, como el choque térmico. Sin embargo, la inducción transcripcional de *SDP1* tiene lugar en respuesta a varias situaciones de estrés (térmico, osmótico, oxidativo...) de manera dependiente del factor de transcripción Msn2/4 (regulador de la expresión de genes en condiciones de estrés), y no del factor de transcripción Rlm1 regulado por la MAPK Slt2 (Hahn & Thiele, 2002).

Además se ha observado que Sdp1 es la primera fosfatasa basada en cisteína que se inactiva por agentes reductores y que aumenta su actividad catalítica en condiciones de estrés oxidativo. Se ha propuesto que este mecanismo podría definir un nuevo grupo de tirosín fosfatasas, en el que se ha sugerido podría estar incluida la fosfatasa de especificidad dual Msg5 (Fox *et al.*, 2007).

6.3.2. Msg5

MSG5 se aisló en 1994 como supresor en multicopia de la letalidad en mutantes *gpa1 Δ* , debida a la activación constitutiva de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G acoplada al receptor de feromona. El análisis de su secuencia reveló que *MSG5* codificaba una proteína fosfatasa de 489 aminoácidos que contenía en su secuencia el "motivo HC" conservado en la familia de las proteínas tirosín fosfatasas (Ile/Val-His-CysX₅Arg) y que mostraba similitud significativa con la fosfatasa de especificidad dual VH1 del virus vaccinia. Como otras MKPs, Msg5 muestra también actividad fosfatasa *in vitro* hacia *pNPP*, para la cual es estrictamente necesaria la presencia del residuo de cisteína situado en la posición 319 del sitio activo (Doi *et al.*, 1994).

En condiciones de estimulación por feromona, la sobreexpresión de *MSG5* reduce la activación transcripcional regulada por el factor de transcripción Ste12 y acelera la reanudación del crecimiento tras la parada de ciclo celular inducida por el estímulo. En esta misma línea, mutantes *msg5 Δ* muestran una capacidad reducida de reestablecer el crecimiento tras la parada del ciclo celular así como un aumento de la fosforilación y actividad enzimática de la MAPK Fus3. Además, al igual que ocurre en numerosas fosfatasas en mamíferos, la transcripción de *MSG5* aumenta en respuesta a la estimulación con feromonas. Todas estas observaciones indican que Msg5 regula el proceso de adaptación tras estimulación con feromona a través de la desfosforilación y por tanto inactivación de la MAPK Fus3 (Doi *et al.*, 1994). Otro dato que apoya este papel es el hecho de que la acumulación nuclear que sufre Fus3 en presencia de feromona, sea inhibida por la sobreexpresión de Msg5 y de Gpa1, subunidad de la proteína heterotrimérica G. De esta forma, ambas trabajan conjuntamente para regular negativamente la señal de apareamiento (Blackwell *et al.*, 2007).

Por tanto, Msg5 participa junto con las tirosín fosfatasas Ptp2 y Ptp3 en la inactivación de Fus3 tras estimulación con feromonas, por lo que la triple mutación *ptp2Δptp3Δmsg5Δ* tiene un efecto sinérgico importante en el proceso de adaptación y de sensibilidad a feromona (Zhan *et al.*, 1997). Se demuestra así la existencia de una regulación coordinada de la función de una MAPK, Fus3, a través de la acción de proteínas tirosín fosfatasas y una fosfatasa de especificidad dual. Msg5 no posee dominios CH₂ (Zhan & Guan, 1999), como ocurre en el caso de las PTPs para interactuar con Fus3; sí se han detectado, sin embargo, posibles dominios de unión tipo *docking* implicados en el establecimiento de interacciones con MAPKs (Flandez *et al.*, 2004; Remenyi *et al.*, 2005).

Andersson y colaboradores (2004) ampliaron el conocimiento sobre el papel de Msg5 como regulador negativo de la MAPK Fus3, mostrando que Msg5 regula a Fus3 también en condiciones basales, tras analizar el fenotipo de un mutante *msg5Δ*. La pérdida de Msg5 induce un aumento del nivel de Fus3 activo y de la expresión del gen reportero de apareamiento *FUS1*, la célula se alarga adoptando la morfología de *smhoo* y se reduce la velocidad de crecimiento celular como consecuencia de una activación constitutiva de la ruta de apareamiento (Andersson *et al.*, 2004).

También se ha sugerido la existencia de una regulación de Msg5 sobre la MAPK Kss1 dado que la sobreexpresión de *MSG5* suprime la osmosensibilidad mostrada en mutantes *pbs2/3*, en los cuales la MEK de la ruta de osmolaridad se encuentra afectada. El fenotipo de estos mutantes es consecuencia del incremento en la fosforilación y actividad de Kss1 en respuesta a choque osmótico, de manera que Msg5 suprime la osmosensibilidad al reducir la activación de Kss1 (Davenport *et al.*, 1999).

En relación a la MAPK de la ruta de integridad celular, en 1995 apareció la primera evidencia de la existencia de una regulación de Slt2 por parte de Msg5, ya que la sobreexpresión de *MSG5* suprimía la inhibición del crecimiento producida por la sobreexpresión de un alelo hiperactivo de la MEK de la ruta de integridad celular, *MKK1^{P386}* (Watanabe *et al.*, 1995). Más tarde, estudios desarrollados en nuestro laboratorio sugirieron la implicación de esta MKP en el mantenimiento de un bajo nivel de fosforilación basal de la MAPK Slt2, ya que la ausencia de *MSG5* induce un aumento del nivel de fosfo-Slt2 fundamentalmente en condiciones basales, aunque también tras choque térmico (Martin *et al.*, 2000). De hecho, Msg5 es, hasta el momento, la proteína fosfatasa más importante implicada en la regulación de la ruta de integridad celular en condiciones basales, a través de la desfosforilación directa de la MAPK Slt2 (Flandez *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2004).

En consistencia con esto, los mutantes *msg5Δ* muestran inducción transcripcional del gen *FKS2*, así como cierta sensibilidad a rojo Congo, fenotipos indicativos de afectación de la pared celular. Ambas proteínas, Msg5 y Slt2, interactúan tanto *in vivo* como *in vitro* a través de sus regiones amino-terminales (regulatoria en el caso de Msg5 y catalítica en el de Slt2) (Flandez *et al.*, 2004).

Sin embargo, esta fosfatasa no parece actuar sobre la MAPK Hog1, ya que la interrupción de *MSG5* en ausencia de Ptp2, uno de los principales reguladores de Hog1, no tiene efecto alguno sobre la fosforilación en la tirosina de Hog1 observada en mutantes *ptp2Δ*. Además, el doble mutante *msg5Δsdp1Δ* exhibe similares niveles de fosfo-tirosina de hog1 que los de la cepa silvestre (Wurgler-Murphy *et al.*, 1997). Acorde a este hecho, la sobreexpresión de *MSG5* no suprime la letalidad de un mutante *sln1Δ* producida por una activación constitutiva de la ruta de Hog1 (Watanabe *et al.*, 1995).

Todo ello sugiere un papel de Msg5 como un regulador negativo general de las MAPKs de levadura tipo ERK.

Una particularidad destaca en esta fosfatasa: Msg5 se produce en la célula como dos isoformas de distinto peso molecular debido a la presencia de dos comienzos de traducción alternativos de su mRNA. La isoforma más larga posee 45 aminoácidos en la región amino-terminal de la proteína que la isoforma corta no posee. Ambas isoformas interaccionan con Slt2, y se sabe que tienen el mismo efecto negativo sobre los niveles de fosforilación de esta MAPK (Flandez *et al.*, 2004).

También se ha observado la existencia de una regulación transcripcional y post-traducciona de Msg5. Como ya se ha mencionado, la transcripción de *MSG5* se induce en respuesta a feromonas con el fin de reducir la activación de Fus3 y contribuir así al proceso de adaptación. Sin embargo, tras la estimulación de la ruta de integridad celular, no aumentan los niveles de transcripción de Msg5 (Jung & Levin, 1999), incluso se ha descrito que un ligero descenso en la cantidad de mRNA tras choque térmico (Hahn & Thiele, 2002) y de la cantidad de proteína (Flandez *et al.*, 2004). De hecho, la ruta de integridad celular no presenta fenómeno de adaptación, de manera que se mantienen altos niveles de fosforilación de Slt2 horas después de la estimulación. Sí se ha descrito, sin embargo, la existencia de un proceso de fosforilación de Msg5 tras la activación de la ruta de integridad celular. Esto se debe a que ambas isoformas son fosforiladas por la MAPK Slt2 mientras dura la presencia del estímulo. Asimismo, en estas condiciones de activación la afinidad entre Slt2 y Msg5 se encuentra disminuida. Se ha sugerido por tanto, que esta modificación postraducciona de Slt2 sobre Msg5 podría ser un mecanismo por el que se regule a su vez la actuación de Msg5 sobre Slt2, ya que disminuye la unión entre ambas proteínas. De esta forma, en condiciones de estimulación de la ruta, se reduciría la actividad catalítica de Msg5 sobre Slt2 con el fin de que la transmisión de la señal en estas condiciones se vea favorecida. Este es el primer modelo descrito en levadura en el que existe una regulación recíproca de una MAPK y su MKP, en el cual la MAPK modula mediante fosforilación la acción de la MKP sobre la MAPK (Flandez *et al.*, 2004).

En al **figura 8** se muestra un esquema de las proteína fosfatasas que regulan las rutas de MAPKs en *S. cerevisiae*, así como la regulación transcripcional de alguna de ellas por las MAPKs.

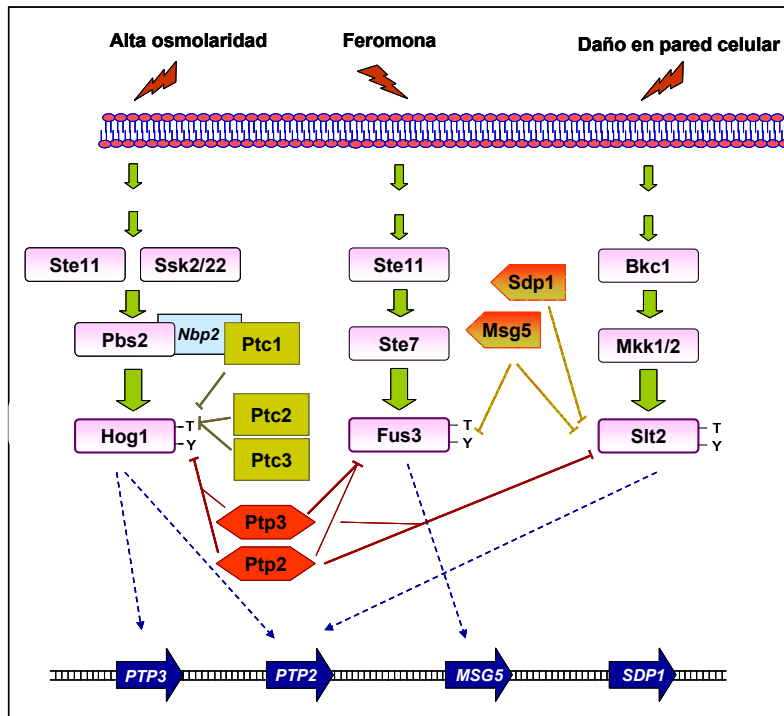


Figura 8. Esquema de tres de las rutas de MAPKs de *S. cerevisiae* y de las proteínas fosfatasa implicadas en la regulación negativa de estas MAPKs. Las serín treonín fosfatasa aparecen sobre un fondo verde; las tirosín fosfatasa sobre fondo rojo, y las fosfatasa de especificidad dual en combinación de verde y rojo; también se diferencian por la forma de la figura en la que aparecen. Las líneas más gruesas indican principal papel como regulador negativo, mientras que las más finas indican un efecto más leve. Las flechas discontinuas indican inducción transcripcional. Reproducido de Martín y colaboradores (2005).

7. INTERACCIONES MEDIADAS POR DOMINIOS *DOCKING*

Son muchos los elementos que contribuyen a la elaboración de una respuesta adecuada, eficaz y específica de las rutas de señalización mediadas por MAPKs frente al estímulo generado. Por tanto, son necesarios mecanismos de regulación muy finos para asegurar que sistemas tan complejos actúen correctamente. La especificidad de la acción está regulada a varios niveles; a través de interacciones mediadas por la presencia de dominios *docking* en las proteínas que participan en la señalización, las interacciones facilitadas por proteínas *scaffold*, la localización subcelular de los componentes de la ruta, así como la inhibición del entrecruzamiento entre las rutas por actuación de las propias MAPKs (Mayor *et al.*, 2007). Mientras que la interacciones mediante dominios *docking* se llevan a cabo mediante regiones específicas conservadas en MAPKs y en las moléculas que interaccionan con éstas, las proteínas *scaffold* interaccionan simultáneamente con dos o más componentes de la cascada, actuando así como andamiaje de la ruta (Tanoue & Nishida, 2003).

Todas las evidencias sugieren que el reconocimiento a través del sitio activo no siempre es suficiente para la formación de un complejo estable MAPK-proteína y por tanto para la transferencia eficaz de fosfato. En la mayoría de las moléculas que interaccionan con MAPKs (MEKS, factores de transcripción y proteína fosfatasas), así como en las propias MAPKs, se han encontrado motivos alejados del centro activo pero esenciales en esta interacción. Estos sitios favorecen la asociación física, y aseguran la eficiencia y selectividad de transmisión de la señal. Asimismo, también influyen en la determinación de la respuesta fisiológica tras la activación de la MAPK, ya que pueden participar en la regulación de la localización subcelular de estas proteínas, así como en la interacción con sus sustratos (Enslen & Davis, 2001). La identificación y caracterización de los sitios de anclaje en las MAPKs y en sus efectores se ha realizado principalmente a través de análisis bioquímicos y mutacionales.

7.1. Sitios de anclaje en las MAPKS

En las MAPKs se ha definido un motivo de anclaje localizado en su extremo carboxilo terminal, en el lado opuesto al centro catalítico. Este dominio se encuentra muy conservado y es conocido como CD (*Common Docking*), ya que es el sitio comúnmente usado por las MAPKs en las interacciones mediadas por dominios *docking* de otras proteínas. El dominio CD se caracteriza por contener aminoácidos cargados negativamente (aspárticos y glutámicos) que interaccionan electrostáticamente con los residuos cargados positivamente presentes en los motivos de interacción de los sustratos, activadores e inactivadores de las MAPKs (Enslen & Davis, 2001). En muchos casos, estas interacciones con el dominio CD son indispensables para conseguir las reacciones enzimáticas eficaces entre las MAPKs y las moléculas con las que interaccionan (Tanoue *et al.*, 2000).

Esta región fue identificada inicialmente en la MAPK *rolled* codificada por el gen *sevenmaker* de *Drosophila melanogaster*, ya que la mutación en un residuo de aspártico en esta zona (D334N) activó la señalización controlada por esta MAPK en ausencia de estimulación (Brunner *et al.*, 1994). Se observó que este fenotipo era consecuencia de una reducción en la unión de la MAPK a la fosfatasa. De igual forma, una mutación análoga a la del *sevenmarker* se introdujo en la MAPK de mamíferos ERK2 (D319N), y también redujo la unión y la sensibilidad de este mutante a la fosfatasa CL-100 (Bott *et al.*, 1994; Chu *et al.*, 1996). Estudios similares realizados en *S. cerevisiae* mostraron que la mutación homóloga en la MAPK Fus3 desestabilizó la unión con otras proteínas a la que se asocia normalmente (Ste7, Ste5, Dig1, Dig2 y Ptp3) (Kusari *et al.*, 2004; Zhan & Guan, 1999) así como a su sustrato Far1 y a la MKP Msg5 (Remenyi *et al.*, 2005).

Sin embargo, la presencia del dominio CD por sí solo no determina la especificidad de las interacciones mediadas por dominios *docking*. Se identificó así otro sitio de anclaje en p38 α , denominado ED, que presenta mayor variabilidad y está localizado también en el lado opuesto al centro activo, próximo al motivo CD. El intercambio de sólo dos de los aminoácidos del motivo ED de p38 con los del motivo ED de ERK2 modificó la especificidad de la interacción mediada por dominios *docking* entre ambas (Tanoue *et al.*, 2001).

Ambos motivos, ED y CD, definen un hendidura en la estructura de la MAPK, cuya composición en aminoácidos determina la fuerza y la especificidad de las interacciones de cada MAPK (surco ϕ -X- ϕ) (Tanoue *et al.*, 2001). De hecho, mutaciones de los residuos presentes en este surco no permiten la unión de p38 al dominio *D* presente en el factor de transcripción MEF2A, lo cual sugiere que residuos homólogos presentes en ERK1/2 y JNK podrían también estar implicados en la interacción con estos dominios *docking* (Roux & Blenis, 2004). Sin embargo, estudios de unión de péptidos que contienen el dominio *D* han permitido observar diferencias entre las tres subfamilias de MAPKs. En ERK2 se producen cambios conformacionales en el CD, mientras que en p38 la reorganización tiene lugar principalmente en el surco hidrófobo de la superficie de interacción. Además, el lazo de activación de ERK2 adopta una conformación distinta a la que presenta en su forma activa o inactiva, mientras que en p38 y JNK, la unión mediante dominios *docking* induce un desorden que no se traduce en una conformación definida del lazo de activación (Mayor *et al.*, 2007).

7.2. Dominios de unión en los sustratos y reguladores de las MAPKs

Los dominios de unión a MAPKs, comúnmente conocidos como dominios *docking*, son regiones aminoacídicas cortas localizadas en las proteínas que interaccionan con las MAPKs para promover reacciones enzimáticas relacionadas con las MAPKs, como su activación por MEKs, desfosforilación por fosfatasas y la fosforilación de sustratos por estas MAPKs (Bardwell, 2006).

La clase más común de dominio identificado y el más caracterizado en las interacciones con MAPKs es el denominado dominio *D* (conocido como dominio *KIM* en las PTPs), que contiene la secuencia consenso $[(K/R)_{1-3}-X^{1-6}-\varphi-X-\varphi]$ (donde φ es un residuo hidrofóbico, normalmente leucina o isoleucina), aunque también se ha descrito la existencia de un grupo de residuos hidrofóbicos después del motivo $\varphi-X-\varphi$. Está compuesto, por tanto, por tres submotivos: un grupo de residuos básicos, un elemento "LXL" y un grupo de aminoácidos hidrofóbicos. Otro motivo de interacción encontrado en quinasas activadas por MAPKs como RSK1 contiene la secuencia consenso $L-X_{1-2}-(R/K)_{2-5}$. Y un tercer motivo denominado motivo *DEF* (*Docking site for ERK and FXFP*), como el que presenta el factor de transcripción Elk-1 de la ruta ERK, contiene la secuencia consenso FXFP (Bardwell & Shah, 2006).

A través de estos motivos se establece la interacción de estas proteínas con los sitios de anclaje en las MAPKs. Los residuos básicos de este dominio *D* se unen a los residuos aminoacídicos cargados negativamente del CD y los residuos hidrofóbicos se unen al hendidura formada entre el CD y ED en la MAPK.

El motivo $L-X_{1-2}-(R/K)_{2-5}$ también establece contactos con la región CD y ED de la MAPK, aunque se desconoce la región a la que se une la zona hidrofóbica de este motivo. El motivo *DEF* se une a un bolsillo hidrofóbico diferente, localizado debajo del centro activo de la MAPK ERK2, oculto en la forma sin fosforilar de la MAPK; por tanto, el motivo *DEF* se une preferentemente a la forma activa fosforilada de ERK2 (Bardwell & Shah, 2006).

El hecho de que la misma región de la MAPK esté implicada en mediar la unión a distintas proteínas sugiere que deben existir fenómenos de competición entre estas proteínas para conseguir la unión a la correspondiente MAPK. En relación con esto, un péptido que contiene dominios *docking* de la fosfatasa de especificidad dual MKP2 inhibe la fosforilación de ERK2 ejercida por la MAPKK MEK2, así como la fosforilación del factor de transcripción Elk-1 por ERK2 (Bardwell *et al.*, 2003).

Las interacciones mediadas por dominios *docking*, además de regular la interacción específica entre proteínas, afectan a la accesibilidad de distintos dominios presentes en las diferentes MAPKs, como en el caso de ERK2, en el que se favorece la exposición de determinados residuos del dominio de activación de esta MAPK. Se ha sugerido que lo mismo podría ocurrir en JNK y p38 (Mayor *et al.*, 2007).

7.2.1. Dominios de unión en MAPKKs

El primer dominio de unión se descubrió en un componente de una ruta de señalización de la levadura *S. cerevisiae*, la MAPKK Ste7, tras observar que su interacción con las MAPKs Fus3 y Kss1 era más específica y estable de lo que se esperaba de una interacción enzima sustrato convencional (Bardwell & Thorner, 1996). Dichos autores comprobaron que sólo los primeros 20 residuos de la región amino-terminal eran necesarios y suficientes para la mediar dicha interacción y que contenía el motivo que caracteriza a los dominios *D* antes mencionados (Bardwell *et al.*, 1996). Se ha identificado la presencia de este motivo en la región amino-

terminal de todas las MEKs de mamífero (**figura 9**) excepto en MEK5, en la que se ha identificado un dominio de interacción diferente, formado fundamentalmente por residuos cargados negativamente (Seyfried *et al.*, 2005). Mutaciones en los residuos conservados entre Ste7 y las MEKs reducen o suprimen la unión a las correspondientes MAPKs (Bardwell *et al.*, 2001). En general, se ha demostrado que los dominios *D* de las MEKs de mamíferos se unen de manera selectiva a sus MAPKs específicas; sin embargo, algunas MAPKs como ERK2, a diferencia de JNK1/2 y p38, no es muy selectiva en su unión a los dominios *docking* presentes en las MEKs de su misma cascada (Bardwell *et al.*, 2009).

Adicionalmente, en Ste7 se identificó un segundo dominio *D* cuya delección conjunta con el primero identificado elimina la capacidad de fosforilación de Kss1 por Ste7. Ambos dominios presentes en la MAPKK Ste7 ejercen funciones redundantes y esenciales (Remenyi *et al.*, 2005). En el caso de mamíferos, mientras que por ejemplo, MKK1-6 contiene un sólo dominio *D* de alta afinidad, MKK7 contiene tres dominios *D* de baja afinidad que interaccionan para crear conjuntamente mayor afinidad (Ho *et al.*, 2006).

MAPKK	Dominio <i>D</i> (K/R) ₁₋₃ -X ¹⁻⁶ -Φ-X-Φ
MEK1	MPKKKPTP---IQLNPA PDG
MEK2	MLARRKPVLPALTIINPTIAE
MKK3	GKSKRKKD---LKLSCMSKP
MKK6	SKGKKRNPG---LKI PK
MKK4	SMQGKRKA---LKLNF
MKK7-D1	NREARRRID---LNLDI
MKK7-D2	ISPQRPRPT---LQLPL
MKK7-D3	TPPARPRHM---LGLPS
ScSte7-D1	TLQRRNLKG--LNLNL
ScSte7-D2	SNLFLRRGIKK-LTLDA

Figura 9. Secuencia de los dominios *D* presentes en las MAPKKs que interaccionan con MAPKs. Aparece indicada la secuencia del dominio *D* o *docking*, estando los residuos básicos en azul y subrayados, y los residuos hidrofóbicos del motivo Φ-X-Φ en rojo. Cuando existe más de un dominio *D* en la misma MAPKK se indica como D1-3. Reproducido de Bardwell (2006).

Las interacciones mediadas por dominios *docking* están estructural y funcionalmente muy conservadas desde levaduras a células humanas; de hecho, pequeños péptidos derivados de MEKs de distintos organismos (MEK1, MEK2 o la MEK de *S. cerevisiae* Ste7) que contienen estos dominios *D* inhiben la unión MEK1-ERK2 *in vitro* y por tanto la fosforilación de la MAPK ERK2 mediada por MEK1 (Bardwell *et al.*, 2001).

Estos resultados revelan la importancia de estos dominios de unión en las MEKs, ya que son claves para la activación de la MAPK *in vivo*, siendo la principal función la de anclar a la MAPK cerca del dominio quinasa de la MEK (Grewal *et al.*, 2006).

La necesidad de estos dominios para la activación de las MAPKs por sus MEKs puede también tener importancia en procesos de infección por algunos patógenos. Por ejemplo, la

proteasa que constituye el factor letal de la toxina *Bacillus anthracis* interrumpe la interacción MEK-MAPK, impidiendo así la transmisión de la señal mediada la MAPK (Bodart *et al.*, 2002).

7.2.2. Dominios de unión en proteínas fosfatasa

Tirosín fosfatasa de mamíferos

En el dominio amino-terminal de tirosín fosfatasa de mamíferos (PTP-SL, STEP y HePTP) se encuentran dominios *KIM* (*Kinase interaction motive*), claves para la interacción con las MAPKs y para su desfosforilación (Mustelin *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 1998). Se caracterizan por contener una secuencia similar a la descrita para los dominios *D* (figura 10) que confiere alta afinidad de unión a sus sustratos, las MAPKs ERK y p38.

Tirosín fosfatasa mamíferos	Dominio <i>KIM</i> (<i>Kinase interaction motive</i>) (K/R) ₁₋₃ -X ¹⁻⁶ -Φ-X-Φ
PTP-SL	GLQERRGSNVSLTL
HePTP	RLQERRGSNVALML
STEP	GLQERRGSNVSLTL

Figura 10. Secuencia de los dominios *docking* presentes en las tirosín fosfatasa de mamífero que interaccionan con MAPKs. Aparece indicada la secuencia del dominio *KIM* estando los residuos básicos en azul y subrayados, y los residuos hidrofóbicos del motivo Φ-X-Φ en rojo. Reproducido de Enslen y Davis (2001).

La unión a través del dominio *KIM* da lugar a una interacción recíproca entre la PTP y la MAPK; por una parte, el dominio amino-terminal de la PTP es fosforilado por la MAPK y por otra parte, esta fosfatasa desfosforila el residuo de tirosina de la MAPK. Ambos procesos van acompañados de cambios conformacionales en ambas proteínas (Mustelin *et al.*, 2005).

Es interesante el hecho de que las interacciones fosfatasa-MAPKs a través del dominio *KIM* también son diana para otros mecanismos de regulación; así, esta asociación se bloquea por la fosforilación de un residuo de serina presente en el dominio *KIM* de PTP-SL y de He-PTP por la proteína quinasa A (PKA) dando como resultado una activación y traslocación nuclear de las MAPKs ERK1/2 o p38. En el caso concreto de He-PTP, estos residuos también son susceptibles de fosforilación por la propia MAPK, favoreciendo la actividad de ERK2. Esta interacción con PTPs no sólo regula la función de las MAPKs sino que también secuestra a las quinasas para definir su localización subcelular. Este puede ser un mecanismo para evitar la traslocación de la MAPK al núcleo donde residen la mayoría de sustratos (Mayor *et al.*, 2007).

Fosfatasa de especificidad dual de mamíferos

También en las fosfatasa de especificidad dual de mamíferos se han identificado diferentes dominios *docking*; mayoritariamente se localizan en la región amino-terminal de las MKPs dominios *D* con los tres submotivos característicos de que se compone que median la unión a las MAPKs ERK y JNKs (figura 11). Sin embargo, no es necesaria la presencia de los tres submotivos para que éste actúe como tal. De hecho, en la fosfatasa MKP7 se han

identificado dos dominios (I y II) en la región amino-terminal que, aún estando incompletos, permiten la interacción con las MAPKs. Así, el dominio I de MKP7 está formado por una serie de residuos básicos e hidrofóbicos y media la unión a ERK Y p38; el dominio II compuesto del submotivo LXL y el submotivo hidrofóbico, es necesario para la interacción con JNK y p38 (Masuda *et al.*, 2003). De hecho, estos dos tipos de dominios *D* incompletos están presentes en la mayoría de las MKPs (**figura 11**).

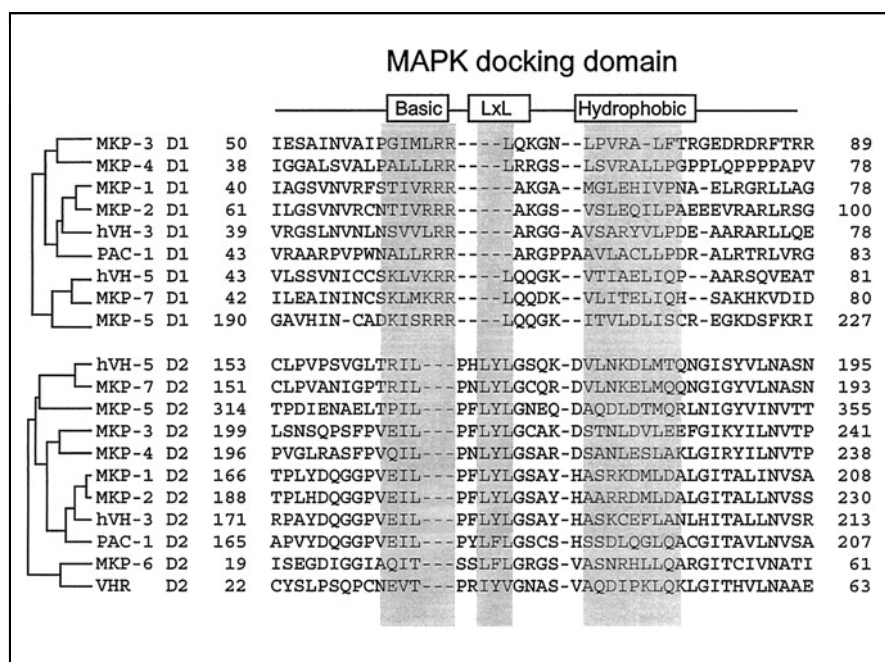


Figura 11. Alineamiento de los dominios *D* incompletos presentes en las MKPs en mamíferos. Reproducido de Masuda y colaboradores (2003).

Las fosfatasa de especificidad dual de bajo peso molecular carecen de este tipo de dominio, aunque, entre ellas, VHR es capaz de inactivar ERK en células, lo cual sugiere que utiliza un mecanismo distinto de interacción (Theodosiou & Ashworth, 2002). También encontramos motivos tipo *DEF* (FXFP y variantes de esta secuencia) en MKP1, MKP2, MKP3, MKPX y MKP4 implicados en la unión con ERK (Theodosiou & Ashworth, 2002).

Tanoue y colaboradores (2002) sugieren que la superficie del dominio *docking* en las MKPs está formada por tres módulos (**figura 12**); los dos primeros módulos se corresponden con el dominio *D* al que nos hemos referido previamente, y el tercer módulo, menos conservado, se compone de aminoácidos cargados positivamente y aminoácidos hidrofóbicos (Tanoue *et al.*, 2002).

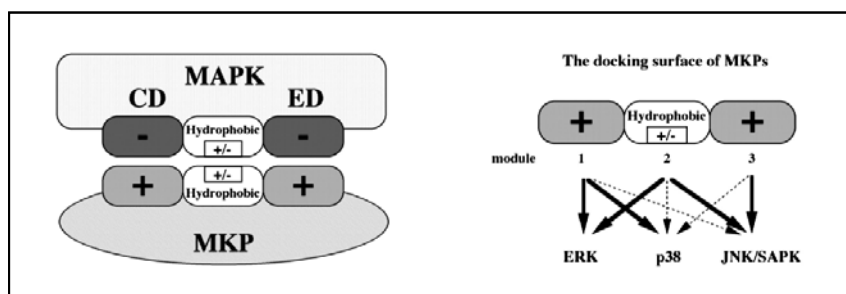


Figura 12. Representación esquemática de las interacciones mediadas por dominios *docking* entre MAPKs y MKPs en mamíferos. Reproducido de Tanoue y colaboradores (2002).

En general, existe una buena correlación entre la unión de la MKP a la MAPK a través del dominio *D*, la activación catalítica de la fosfatasa y su capacidad de inactivación de la MAPK (Biondi & Nebreda, 2003). Es el caso del dominio *D* de MKP3 que contribuye al reconocimiento específico de ERK2, la activación catalítica de MKP3 y la consecuente desfosforilación e inactivación de la MAPK a la que se une (Nichols *et al.*, 2000).

Proteín fosfatasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Al igual que en mamíferos, en la región amino-terminal de la fosfatasa de especificidad dual de levadura Msg5, se ha identificado la presencia de dos posibles dominios de unión a MAPKs (Flandez *et al.*, 2004; Remenyi *et al.*, 2005). Sin embargo, la MKP Sdp1 carece de esa región, lo cual sugiere que secuencias presentes en el dominio catalítico de este tipo de fosfatasa son las responsables de mediar la interacción con la MAPK (Hahn & Thiele, 2002).

También en Ptp3 se ha identificado un dominio *D* formado fundamentalmente por aminoácidos básicos ($R^{145}R^{146}R^{147}$) implicado en interacción con la MAPK Fus3. Además posee motivos *DEF* que favorecen esta interacción aunque se sitúan fuera del dominio de Ptp3 necesario y suficiente para la unión a Fus3 (Zhan & Guan, 1999). Además de los dominios *docking*, en Ptp3 existen dos motivos CH_2 necesarios para la interacción con la MAPK Fus3 (Zhan & Guan, 1999). Este tipo de dominios están presentes en la región N-terminal de las MKPs de mamíferos, mientras que las PTPs de esta especie carecen de ellos. Sin embargo en levadura además de Ptp3, Ptp2 posee estos dominios mientras que la MKP Msg5 no, lo cual indica que existe una conservación de las características estructurales de la región amino-terminal entre MKPs de mamíferos y PTPs de levadura (Martin *et al.*, 2005).

7.2.3. Dominios de unión en otras proteínas que interaccionan con MAPKs

Paralelamente al descubrimiento del primer dominio *D* en Ste7, se identificó un pequeño motivo similar, denominado dominio δ , en el factor de transcripción c-Jun, sustrato de JNK en mamíferos. Este motivo promueve la unión y fosforilación de c-Jun por JNK, y por tanto la consecuente activación de su dominio de activación transcripcional (Kallunki *et al.*, 1994). Secuencias similares se han identificado en muchos factores de transcripción, incluyendo

miembros de las familias bCIP, ETS y MADS reguladas por ERK (Sharrocks *et al.*, 2000). También en la subfamilia Elk de factores de transcripción ETS se han identificado secuencias que se corresponden a la del dominio *D* de unión a ERK, así como dominios tipo *DEF* involucrados en favorecer la eficiencia de la fosforilación por la MAPK. Ambos motivos forman un sistema flexible con dos funciones; por una parte, la afinidad del sustrato por ERK se puede regular por el número, tipo, posición y colocación de estos dominios, y por otro lado, estos sitios de anclaje pueden dirigir la fosforilación de residuos específicos del sustrato en el caso de que existan múltiples sitios de fosforilación (Fantz *et al.*, 2001). Los factores de transcripción MEF2A Y MEF2C también presentan dominios *docking* de unión a p38.

Por tanto, cada una de las MAPKs de mamíferos incrementan la fosforilación de sustratos a través de la presencia de estos dominios, pudiendo ser alguno de ellos reconocido por más de una clase de MAPK (Biondi & Nebreda, 2003).

Sustratos	Dominio <i>D</i> (K/R) ₁₋₃ -X ¹⁻⁶ -φ-X-φ
c-Jun	SNP <u>K</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>K</u> QSMT <u>L</u> NLADPVGS
ATF2	AVH <u>K</u> <u>H</u> <u>K</u> HE— <u>M</u> TLKFGPAR
ELK1	QPQ <u>K</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>K</u> PRD- <u>L</u> ELPLSPSL
Dig1	KSL <u>K</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>R</u> VPAP <u>L</u> NLSDSNTN
Dig2	HSL <u>K</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>R</u> VPPA <u>L</u> NFSDIQAS
yFar1	MMS <u>K</u> <u>R</u> GNIPKP <u>L</u> NLSKPISP

Figura 13. Secuencia de los dominios *D* presentes en las otras proteínas que interaccionan con MAPKs. Aparece indicada la secuencia del dominio *D*, estando los residuos básicos en azul y subrayados, y los residuos hidrofóbicos del motivo φ-X-φ en rojo. Reproducido de Bardwell (2006).

Existen además varios dominios *docking* definidos en proteínas *scaffold* como en la proteína JIP-1 mediando la unión a JNK (Dickens *et al.*, 1997).

Entre las proteínas de unión a las MAPKs de *S. cerevisiae* con dominios *docking* se encuentra Far1, sustrato fosforilado por Fus3 tras activación de la ruta de apareamiento. Este dominio exhibe alta selectividad de unión a Fus3 y resulta necesario para la parada de ciclo celular que se induce en presencia de feromona (Remenyi *et al.*, 2005).

Antecedentes

Esta tesis doctoral continúa la línea del trabajo iniciado en nuestro Departamento sobre la caracterización de los elementos implicados en la regulación de las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y en especial de la ruta de integridad celular. Concretamente se ha llevado a cabo el estudio de un regulador negativo de la MAPK Slt2, la fosfatasa de especificidad dual Msg5.

Los primeros estudios realizados en nuestro laboratorio en esta línea sugirieron la implicación de Msg5 en el mantenimiento de un bajo nivel de fosforilación basal de la MAPK Slt2. Posteriormente, nuestro grupo profundizó en el estudio de la función de Msg5 sobre MAPK de la ruta de integridad celular Slt2, así como en los mecanismos que regulan su actividad. Entre los hallazgos más relevantes se descubrió que esta fosfatasa se expresa en la célula como dos isoformas de distinto peso molecular debido a la presencia de comienzos de traducción alternativos y que ambas isoformas son fosforiladas por Slt2 tras la estimulación de la ruta.

Con el fin de ampliar el conocimiento sobre la función que ejerce esta fosfatasa en el control de la señalización mediada por MAPKs, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la importancia funcional de Msg5 a través del estudio del perfil transcripcional global en ausencia de esta fosfatasa.
2. Determinar el papel de Msg5 en la regulación negativa de la MAPK de la ruta de filamentación Kss1.
3. Estudiar la interacción de cada una de las dos formas de Msg5 con las distintas MAPKs de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como la función de cada una de estas isoformas.
4. Determinar qué dominios presentes en Msg5 median la interacción con las distintas MAPKs, y por tanto los mecanismos que regulan la especificidad de acción de Msg5 sobre las rutas reguladas por dichas MAPKs.

Materiales y Métodos

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo fueron:

BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
Y07373	isogénica BY4741, <i>msg5Δ::KanMX4</i>	Euroscarf
Y00993	isogénica BY4741, <i>slt2Δ::KanMX4</i>	Euroscarf
Y03042	isogénica BY4741, <i>fus3Δ::KanMX4</i>	Euroscarf
Y06981	isogénica BY4741, <i>kss1Δ::KanMX4</i>	Euroscarf
Y04500	isogénica BY4741, <i>itc1Δ::KanMX4</i>	Euroscarf
YMM1	isogénica BY4741, <i>RLM1::6MYC::LEU2</i>	Este trabajo
YMM2	Isogénica Y07373, <i>RLM1::6MYC::LEU2</i>	Este trabajo
YMM3	isogénica BY4741, <i>SLT2::6MYC::LEU2</i>	Este trabajo
YMM4	Isogénica BY4741, <i>msg5Δ::KanMX4 SLT2::6MYC::LEU2</i>	Este trabajo
YMM5	Isogénica YMM2 <i>ste7Δ::URA3</i>	Este trabajo
SEY6211	MATa <i>trp1Δ901 leu2 3112 ade2-101 ura3-52 his3-Δ200 suc2Δ9</i>	(Rodríguez-Pachon <i>et al.</i> , 2002)
YTX50	Isogénica SEY6211, <i>ste7Δ::LEU2</i>	(Rodríguez-Pachon <i>et al.</i> , 2002)
HM52	Isogénica SEY6211, <i>slt2Δ::LEU2</i>	Dr. H. Martín
YMF1	Isogénica 1783, <i>MSG5::6MYC::LEU2</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
DD1 – 2B	MATa <i>ura3 his2 trp1 leu3 ade1</i>	(Doi <i>et al.</i> , 1994)
DD1 – 2D	MATa , <i>ura3, his2, trp1, leu2, ade1, msg5-1Δ :: LEU2.</i>	(Doi <i>et al.</i> , 1994)
Y190	MATa <i>ura3-52 his3-Δ200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3, 112gal4Δgal80Δ URA3::GAL1 UAS-GAL1 TATA-lacZ LYS2::GAL UAS-HIS3 TATA-HIS3</i>	Clontech
PJ69-4A	MATa, <i>trp1-901, leu2-3112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)

1.2. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo fueron:

DH5 α (Hanahan, 1983), cuyo genotipo es: *supE44 Δ lacU169(Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1*.

BL21(DE3) cuyo genotipo es: *hsdS gal λ (lac UV5-T7 gene1) ind1 Sam7 nin 5*.

2. MEDIOS DE CULTIVO

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizó agua desionizada. Estos medios fueron esterilizados en el autoclave a una temperatura de 121 °C y a 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos. Para la obtención de medios sólidos, se añadieron 20 g/l de agar a su composición antes de ser esterilizados.

2.1. Medios de cultivo empleados para *S. cerevisiae*

Los medios utilizados para el crecimiento de *S. cerevisiae* fueron los siguientes:

YPD: Medio rico empleado para el crecimiento de forma rutinaria de levaduras: 20 g/l de glucosa, 20 g/l de peptona, 10 g/l de extracto de levadura.

YPA: Medio rico con idéntica composición al YPD suplementado con adenina al 0.01% para facilitar el crecimiento de las células diploides del sistema de doble híbrido.

SD: Medio mínimo, 20 g/l de glucosa, 5 g/l de sulfato amónico, 1,7 g/l de base nitrogenada (DIFCO), 2 g/l de mezcla de aminoácidos. Dicha mezcla de aminoácidos contiene:

Adenina 0,5 g; Alanina 2,0 g; Arginina 2,0 g; Asparragina 2,0 g; Ácido aspártico 2,0 g; Cisteína 2,0 g; Glutamina 2,0 g; Ácido glutámico 2,0 g; Glicina 2,0 g; Histidina 2,0 g; Inositol 2,0 g; Isoleucina 2,0 g; Leucina 10,0 g; Lisina 2,0 g; Metionina 2,0 g; Ácido para-Aminobenzoico 2,0 g; Fenilalanina 2,0 g; Prolina 2,0 g; Serina 2,0 g; Treonina 2,0 g; Triptófano 2,0 g; Tirosina 2,0 g; Uracilo 2,0 g y Valina 2,0 g.

Esta mezcla puede variar según el experimento, eliminándose de su composición aminoácidos utilizados en la selección de transformantes.

2.2. Medios de cultivo empleados para *E. coli*

Los medios utilizados para el cultivo de *E. coli* fueron:

Medio LB (Luria-Bertani): 10 g/l triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5-10 g/l de cloruro sódico. Cuando era necesario, se adicionaba al medio, una vez atemperado, ampicilina para obtener una concentración final de 50 mg/l.

3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

3.1. Condiciones de crecimiento de microorganismos

Las cepas de levadura se incubaron a 24°C o 39°C en función del experimento. Cuando era necesaria la agitación, ésta se llevaba a cabo en incubadores a 200-220 rpm.

Las cepas de *E.coli* se cultivaron a 37°C, a velocidades de agitación de 200-220 rpm.

3.2. Determinación del crecimiento de microorganismos

El crecimiento de los cultivos se determinaba mediante la medida de su absorbancia a 600nm (densidad óptica) en un espectrofotómetro Beckman DU640. Antes de su determinación, las muestras se diluían para que la absorbancia se encontrara en un intervalo de valores entre 0.05 y 0.5.

4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Se utilizaron los protocolos clásicos de biología molecular (Sambrook, 1989) para las técnicas básicas de aislamiento de DNA plasmídico de *E.coli* mediante lisis alcalina, digestión con enzimas de restricción, desfosforilación del extremo 5' del DNA, etc.

Las enzimas de restricción, la T4 DNA-ligasa y la DNA fosfatasa (procedente de intestino de ternera, CIAP) procedían de Roche diagnostics. La elución de fragmentos de DNA de geles de agarosa se realizó mediante el kit comercial Gene clean (Q-BIOgene-BIO101 systems). La transformación de *E.coli* se realizó según el método de Hanahan (1983). La amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un MiniCycler PTC-150 (MJ Research) según los protocolos descritos en (Sambrook, 1989). La secuenciación de DNA se realizó en la Unidad de Secuenciación Automatizada de DNA de la UCM. La electroforesis del DNA se realizó en geles con un 0,8 % de agarosa, preparados en tampón TAE (0,004 M Tris acetato, 0,001 M EDTA), siendo visualizados los fragmentos de DNA mediante tinción con bromuro de etidio (concentración final 0,5 mg/ml) y observación en un transiluminador de luz UV.

La mutagénesis de residuos puntuales en el gen de *MSG5* se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida (Hu *et al.*, 1999), empleando la enzima DNA polimerasa, Turbo *PfuI* (Stratagene) y utilizando los oligonucleótidos diseñados que amplificaban el plásmido con la secuencia de DNA a mutagenizar pero sustituyendo las bases necesarias para conseguir las mutaciones deseadas.

4.1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

RLM1I: 5'-GGGTCGACATGGGTAGACGGAAGATTG-3'

RLM1F: 5'-CCGTCGACTAACTGCAGTATTTTGCTGAATTTTTCTCC-3'

FUS3I: 5'-CCCCGGGATCCATGCCCAAAGAGAATTG-3'

FUS3F: 5'-CCCCGGGATCCACTAAATATTTTCGTTCC-3'

KSS1I: 5'-CCCCGGGATCCATGGCTAGAACCATAA-3'

KSS1F: 5'-CCCCGGGATCCTTCCATGGTCTTCATTAG-3'

MSG5RRU: 5'-CCACCATCGCTGTCGATGGCGGCAAGCGAGGCCTC-3'

MSG5RRD: 5'-GAGGCCTCGCTTGCCGCCATCGACAGCGATGGTGG-3'

MSG5D1U: 5'-GGAATACCAAAAATGCATCTGCAGATATAGCAGCACTCCATCC-3'

MSG5D1D: 5'-GGATGGAGTGCTGCTATATCTGCAGATGCATTTTTGGTATTCC-3'

ACTF: 5'-ATCACCGCTTTGGCTCCAT-3'

ACTR: 5'-CCAATCCAGACGGAGTACTTTCTT-3'

YBR040W F: 5'-GCTCGGTTCCCTTATACAGAGACT-3'

YBR040W R: 5'-TGGGTTTTGGAGCTGGAAGA-3'

YJL170CF: 5'-TGAAGAAGGTAGCCACGATGT-3'

YJL170CR: 5'-CAGTCGCGGAAGGTCTTACG-3'

4.2. Plásmidos previamente contruidos y utilizados en este trabajo

Ycplac22	<i>ori CEN4 TRP1 lacZ</i>	(Gietz & Sugino, 1988)
Ycplac22-MSG5myc	<i>ori CEN4 TRP1 lacZ MSG5-6MYC</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
Ycplac22-MSG5-M1Amyc	<i>ori CEN4 TRP1 lacZ MSG5-M1A 6MYC</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
Ycplac22-MSG5-M45Amyc	<i>ori CEN4 TRP1 lacZ MSG5-M45-6MYC</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
pRS416	<i>ori CEN6 URA3 lacZ</i>	(Sikorski & Hieter, 1989)
pRS416-MKK1myc	<i>ori CEN6 URA3 lacZ MKK1-6MYC</i>	(Jimenez-Sanchez <i>et al.</i> , 2007)
pGEX(KG)	<i>bla ori Ptac-GST</i>	(Guan & Dixon, 1991)
pGEX(KG)MSG5	<i>bla ori Ptac-GST MSG5</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
pGEX(KG)MSG5C319A	<i>bla ori Ptac-GST MSG5C319A</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
pGEMT	<i>bla ori lacZ</i>	Promega
pGEMTMSG5	<i>bla ori lacZ MSG5</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
pEG(KG)	<i>ori 2μ bla URA3 GAL1p-GST</i>	(Mitchell <i>et al.</i> , 1993)
pEG(KG)MSG5	<i>ori 2μ bla URA3 GAL1p-GST MSG5</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
pEG(KG)SLT2	<i>ori 2μ bla URA3 GAL1p-GST SLT2</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)

pRS305myc	<i>ori bla LEU2 lacZ 6MYC</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
pRS305- <i>MSG5</i> myc	<i>ori bla LEU2 lacZ MSG5-6MYC</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
pRS305 <i>SLT2</i> myc	<i>ori bla LEU2 lacZ SLT2-6MYC</i>	(Flandez <i>et al.</i> , 2004)
pNC149	pUC118-1 que contiene la cassette de interrupción <i>ste7::URA3</i>	(Company <i>et al.</i> , 1988)
BG1805- <i>HSP90</i>	<i>bla URA3 GAL1p HSP90</i>	Open biosystem
BG1805- <i>CDC37</i>	<i>bla URA3 GAL1p CDC37</i>	Open biosystem
pGAD424	<i>ori 2μ bla LEU2 ADHp-GAL4a</i>	Dr. Fields
pGBT9	<i>ori 2μ bla TRP1 ADHp-GAL4b</i>	Dr. Fields
pGBKT7	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kan^r c-Myc</i>	Clontech
pGADT7	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA</i>	Clontech
pGADT7 <i>KSS1</i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA KSS1</i>	Dr. Keyse
pGADT7 <i>SLT2</i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA SLT2</i>	Dr. Keyse
pGADT7 <i>FUS3</i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA FUS3</i>	Dr. Keyse
pGADT7 <i>KSS1 DN</i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA KSS1 DN</i>	Dr. Keyse
pGADT7 <i>SLT2 DN</i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA SLT2 DN</i>	Dr. Keyse
pGADT7 <i>SLT2 DDENN</i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA SLT2 DDNN</i>	Dr. Keyse
pGADT7 <i>FUS3 DN</i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA FUS3 DN</i>	Dr. Keyse
pGBKT7 <i>MSG5</i>	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kan^r c-Myc MSG5</i>	Dr. Keyse
pGBKT7 <i>MSG5</i> ¹²⁶⁻⁴⁸⁹	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kan^r c-Myc MSG5¹²⁶⁻⁴⁸⁹</i>	Dr. Keyse
pGBKT7 <i>MSG5</i> ¹⁻¹²⁵	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kan^r c-Myc MSG5¹⁻¹²⁵</i>	Dr. Keyse
pGBKT7 <i>MSG5</i> ⁹⁰⁻⁴⁸⁹	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kan^r c-Myc MSG5⁹⁰⁻⁴⁸⁹</i>	Dr. Keyse
pGBKT7 <i>MSG5</i> ¹⁻⁴⁵	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kan^r c-Myc pGBKT7MSG5¹⁻⁴⁵</i>	Dr. Keyse
pGBKT7 <i>MSG5</i> ⁴⁶⁻⁴⁸⁹	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kan^r c-Myc MSG5⁴⁶⁻⁴⁸⁹</i>	Dr. Keyse
pGBKT7 <i>MSG5</i> ^{MD1}	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kan^r c-Myc MSG5^{MD1}</i>	Dr. Keyse

pGBT7MSG5 ^{MD2}	ori 2 μ GAL4 DNA-BD TRP1 kan ^r c-Myc MSG5 ^{MD2}	Dr. Keyse
pGBT7MSG5 ^{MD1/2}	ori 2 μ GAL4 DNA-BD TRP1 kan ^r c-Myc MSG5 ^{MD1/2}	Dr. Keyse
pJV89GL	ori CEN4 URA3 CRH1-GFP	(Cabib <i>et al.</i> , 2007)
Ycp50SLT2 ^{T190F}	ori CEN4 URA3 SLT2 ^{T190F}	(Lee <i>et al.</i> , 1993)
Ycp50SLT2 ^{Y192F}	ori CEN4 URA3 SLT2 ^{Y192F}	(Lee <i>et al.</i> , 1993)

4.3. Plámidos generados en este trabajo

YcPlac22MSG5 ^{MD1} myc	Mutagénesis dirigida sobre el vector YcPlac22MSG5myc empleando los oligonucleótidos MSG5RRU y MSG5RRD
YcPlac22MSG5 ^{MD2} myc	Mutagénesis dirigida sobre el vector YcPlac22MSG5myc empleando los oligonucleótidos MSG5D1U y MSG5D1D
YcPlac22MSG5 ^{MD1/2} myc	Mutagénesis dirigida sobre el vector YcPlac22MSG5 ^{MD2} myc empleando los oligonucleótidos MSG5D1U y MSG5D1D
pGBT9MSG5 ^{MD1}	Se subclonó el fragmento <i>NcoI</i> - <i>ClaI</i> con el marco abierto de <i>MSG5</i> procedente de YcPlac22MSG5 ^{MD1} myc en el punto <i>NcoI</i> - <i>ClaI</i> del vector pGBT9
pGBT9MSG5 ^{MD2}	Se subclonó el fragmento <i>NcoI</i> - <i>ClaI</i> con el marco abierto de <i>MSG5</i> procedente de YcPlac22MSG5 ^{MD2} myc en el punto <i>NcoI</i> - <i>ClaI</i> del vector pGBT9
pGBT9MSG5 ^{MD1/2}	Se subclonó el fragmento <i>NcoI</i> - <i>ClaI</i> con el marco abierto de <i>MSG5</i> procedente de YcPlac22MSG5 ^{MD1/2} myc en el punto <i>NcoI</i> - <i>ClaI</i> de pGBT9
pEG(KG) <i>FUS3</i>	Se amplificó por PCR el gen <i>FUS3</i> empleando los oligonucleótidos FUS3I y FUS3F. El producto de la PCR se clonó en el vector pGEMT y se secuenció. El fragmento BamHI se subclonó en el punto BamHI del vector pEG(KG)
pEG(KG) <i>KSS1</i>	Se amplificó por PCR el gen <i>KSS1</i> empleando los oligonucleótidos KSS1I y KSS1F. El producto de la PCR se clonó en el vector pGEMT y se secuenció. El fragmento BamHI se subclonó en el punto BamHI del vector pEG(KG).
pRS305RLM1myc	Se amplificó el marco abierto de lectura de <i>RLM1</i> a partir de DNA genómico de la cepa BY4741 empleando los oligonucleótidos RLM1I y RLM1F y se subclonó en el punto SalI-PstI del vector integrativo pRS305m. Para integrar <i>RLM1-6MYC</i> , este plásmido fue linearizado con <i>NdeI</i>

5. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONALES

5.1. *Microarrays* de DNA

5.1.1. Extracción de RNA

Tras la recogida de las células de *S. cerevisiae* se llevaba a cabo la extracción de RNA usando columnas del kit RNeasy Midi (QIAGEN) utilizando el procedimiento de rotura mecánica de células descrito en las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA total obtenido se determinaba midiendo la absorbancia a 260 nm y su calidad se comprobaba usando RNA Nano Labchips en el equipo Bioanalyzer 2100B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)

5.1.2. Síntesis, marcaje e hibridación de arrays de cDNA

A partir de 25-30 µg de RNA total obtenido se sintetizaba el cDNA (incorporando nucleótidos que presentan grupos aminoalil) por retrotranscripción usando el kit de marcaje CyScribe™ (Amersham Biosciences). A continuación se llevaba a cabo una purificación y un marcaje de los cDNA de las dos condiciones en los residuos aminoalil generados durante la síntesis. El marcaje se realizaba con los fluorocromos Cy3 y Cy5 incluidos en el kit CyScribe™ Post-Labeling (Amersham Biosciences) durante 2 horas en oscuridad, siguiendo las instrucciones del fabricante (distinto marcaje en cada una de las muestras que se comparan dos a dos).

Una vez marcados los cDNAs se medía la incorporación de fluorocromo mediante un espectrofotómetro. Los dos tipos de cDNAs marcados con diferentes fluorocromos Cy3 o Cy5 para las muestras de las dos condiciones (cepa silvestre y cepa mutante *msg5Δ*) correspondientes a un mismo experimento se mezclaban, purificaban en columna y se liofilizaba en "Speed vac". La mezcla liofilizada de cDNAs marcados se resuspendía en 250 µl de la solución de hibridación (50% Formamida, 6x SSC, 0.5% SDS, 5x Denhardt's, 20 µg Poly(A) (Sigma) y espermatozoos de salmón (Gibco) 100 µg/ml).

Los *microarrays* empleados en este trabajo proceden del Centro de *Microarrays* de la *University Health Network*, Toronto (Canada). Contienen impresos 6306 ORFs del genoma de *S. cerevisiae*. En paralelo al proceso de marcaje de la muestra problema, los *microarrays* se prehibridaban con solución de prehibridación (6x SSC, 0.5% SDS, 1% BSA (Sigma)) durante 1 hora y se llevan a cabo cinco lavados en agua destilada. A continuación se procedía a poner en contacto la superficie impresa del *microarray* con la mezcla de hibridación que se incubaba durante 18 horas. Las hibridaciones se realizaron en la estación de hibridación Lucidea™ SlidePro (Amersham Biosciences) que realiza de forma automatizada los procesos de hibridación, lavado y secado de varios *microarrays* simultáneamente. Para cada condición a testar se analizaba el RNA total de dos cultivos diferentes y se realizaban a su vez dos hibridaciones por cada cultivo. Se llevaba a cabo un intercambio en los fluorocromos empleados en el marcaje de los cDNA a comparar para eliminar variabilidades debido a la eficiencia de

incorporación de los dos fluorocromos utilizados. De este modo, para cada condición se analizaban cuatro *microarrays*.

5.1.3. Análisis de imágenes de *microarrays*

Los *microarrays* (formato portaobjeto) fueron escaneados usando un escáner GenePix 4000B (Axon Instruments) a una resolución de 5 μm /píxel, usando valores de PMT entre 550 a 700 y potencia del láser 100%. La emisión de los láseres a 543 nm y 620 nm de longitud de onda generaba las imágenes correspondientes a la señal de hibridación de los cDNAs marcados con los fluorocromos Cy3 y Cy5 respectivamente.

Para realizar el análisis de la imagen y segmentación de la información se utilizaba el programa GenePix Pro versiones 4.0 y 5.0 (Axon Instruments). Mediante este programa se asociaba los datos de intensidad de fluorescencia de cada uno de los puntos del *microarray* con el gen correspondiente y se obtenían los archivos incluyendo las imágenes para cada canal (Cy3/Cy5). El procesamiento de cada imagen se realizaba utilizando el programa mencionado según las instrucciones del fabricante. Cada uno de los puntos de información en la imagen para cada gen denominados "*spots*" (del inglés puntos) fueron filtrados siguiendo un criterio concreto de calidad. A partir de dicha imagen procesada se obtenía un listado en formato .txt de la información numérica de intensidades de fluorescencia y ratios de señal y fondo ("*background*") de cada uno de los "*spots*" en cada uno de los canales correspondientes a Cy3 y Cy5.

5.1.4. Procesamiento de datos y métodos estadísticos

El tratamiento estadístico de los datos se realizó en la Unidad de genómica UCM/PCM.

El primer paso de procesamiento de datos consistía en que aquellos "*spots*" cuya intensidad media de señal menos el fondo (intensidad neta) no superaba la media del fondo total (este valor medio se calcula usando el fondo local de cada "*spot*") en alguno de los dos canales (Cy3 o Cy5), eran filtrados y descartados para el análisis posterior.

Sin embargo, algunos de los genes que presentaban baja intensidad sólo en un canal, podían tener un gran interés biológico. Eran genes que podían tener una baja expresión en la situación basal y expresarse de forma elevada en la situación experimental o viceversa. Para evitar perder este grupo de genes, se establecía un criterio en el que el dato correspondiente a ese "*spot*" era recuperado cuando en cualquiera de los dos canales (Cy3 o Cy5), el valor de intensidad neta era cinco veces superior a la media del fondo local de todo el *microarray* en ese canal.

El segundo nivel de control de calidad aplicado correspondía al estudio de la reproducibilidad de las réplicas dentro del mismo *microarray*. Los arrays utilizados contenían todas las sondas por duplicado dispuestas de forma consecutiva. Se llevaba a cabo un análisis de la reproducibilidad de las réplicas generando la distribución normal log2 (RA x 1/RB) siendo RA y RB los ratios tratamiento/control (Cy3/Cy5 o viceversa) de las réplicas después de sustraer

el fondo. Las réplicas que se desviaban de la media en más de ± 3 SD, eran filtradas y descartadas.

Para el posterior análisis sobre los datos procedentes de "spots" que superasen los filtros anteriormente descritos utilizamos el programa informático GeneSight 4.0 (BioDiscovery Inc.). La normalización dependiente de la intensidad se llevó a cabo mediante el método de *lowess*. El objetivo de este método es corregir patrones de no linealidad. El análisis de la significación estadística llevado a cabo era un t-student realizado también mediante el programa GeneSight 4.0. Se consideraba que los genes con valores de probabilidad $p < 0.05$ presentaban diferencias significativas en la expresión de la condición tratamiento respecto a la situación control, seleccionando dentro de este grupo aquellos que presentaban ratios ≥ 2 o ≤ 0.5 .

Los datos obtenidos de los *microarrays* descritos en este trabajo cumplen las recomendaciones MIAME y han sido depositados en *The National Center for Biotechnology Information gene expression hybridation arrays data repository* (*Gene Expression Omnibus* (GEO)) con el número de acceso GSE12104.

5.1.5. Visualización de resultados y clustering

Se utilizaron distintos soportes informáticos para llevar a cabo la representación de la respuesta transcripcional, el análisis del agrupamiento de genes por sus perfiles de expresión y el análisis de significación estadística de las funciones de dichos grupos de genes.

TMEV de TIGR: Este programa es de acceso libre en internet <http://www.tigr.org/software/>. En la mayoría de los casos se empleó clustering jerárquico y medidas de distancias euclidianas.

Genecodis: Accessible en la página web <http://genecodis.dacya.ucm.es/> (Unidad de bioinformática, CNB. Madrid), fue utilizada para determinar la significación biológica (por su anotación) de un grupo de genes (que tengan un perfil transcripcional similar) frente a la lista completa de genes anotados como referencia.

YEATRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking):

Es una base de datos en la que hay depositada información sobre más de 30990 asociaciones entre factores de transcripción y genes de *S. cerevisiae*, y que se basa en más de 1000 referencias bibliográficas. También incluye la descripción de los sitios específicos de unión a DNA de más de 100 factores de transcripción. YEATRACT permite hacer búsquedas para obtener información biológica de un conjunto de datos y poder predecir de algún modo los mecanismos de regulación de transcripción en la levadura a partir de los datos obtenidos mediante análisis globales de expresión. Es accesible en internet en la página: <http://www.yeactract.com/> (Teixeira *et al.*, 2006).

5.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Esta técnica permite llevar a cabo la cuantificación de ácidos nucleicos con gran precisión, imponiéndose hoy día como método de referencia para realizar estudios de expresión génica a pequeña escala. En las células de *S. cerevisiae* recogidas para llevar a cabo los experimentos de RTPCR-cuantitativa se extraía el RNA usando columnas del kit RNAeasy Mini(QIAGEN), y se utilizaba el procedimiento de disrupción mecánica descrito en las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA se determinaban midiendo la absorbancia a 260 nm y su calidad se comprobaba usando RNA Nano Labchips en el bioanalizador 2100B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). La generación de cDNA se realizaba usando el kit *Reverse Transcription System* (Promega®) empleando 2.5 µg de RNA total, siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa a tiempo real se llevaba a cabo utilizando un equipo ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) utilizando las condiciones de amplificación recomendadas por defecto. Se empleaba como molde 5 µl de una dilución 1/100 con agua destilada de cada cDNA sintetizado por reacción de PCR. La expresión de cada gen fue normalizada relativizando los valores según la expresión del gen control *ACT1*, y los ratios de variación de la expresión de cada gen en estudio (tratamiento versus control) fueron obtenidos siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito en (Livak & Schmittgen, 2001). Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes *FIG1*, *ASG7* y *ACT1* fueron diseñados utilizando el programa informático Primer Express. Los oligonucleótidos se diseñaron en la zona 3' de cada transcrito, siendo la región amplificada resultante de aproximadamente 70 pb.

6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE *WESTERN-BLOTTING*

6.1. Obtención de extractos proteicos y preparación de muestras para electroforesis (SDS-PAGE)

Los preinóculos de células de levadura se cultivaban toda la noche a 24°C en el medio correspondiente. Posteriormente se refrescaban hasta la densidad óptica de 0.3, se cultivaban hasta alcanzar una densidad óptica en torno a 0.5, y se les sometía al estímulo correspondiente. Para obtener un cultivo control, en ausencia de activación, se refrescaban los cultivos por duplicado, de manera que uno se mantenía a 24°C sin someterse a la presencia de ningún estímulo. A continuación, las células se recogían en un tubo de centrifuga Falcon o en un tubo de plástico de 10 ml con hielo. Se centrifugaban a 4°C y 2800 rpm durante 5 minutos, se lavaba el sedimento con agua fría, se transfería a un tubo eppendorf y se volvía a centrifugar para descartar el sobrenadante. Las células se congelaban directamente en hielo seco para romperlas posteriormente o se conservaban a -80 °C hasta su rotura.

Para la rotura de las células, éstas eran resuspendidas en tampón de lisis frío que se componía de 50mM Tris HCl pH 7,5, 10% de glicerol, 0,1% de NP40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50 mM NaF, 50 mM β -glicerol-fosfato, 5 mM pirofosfato sódico y 1 mM ortovanadato sódico. A este tampón de lisis se le adicionaba, antes de su utilización, los inhibidores de proteasas: fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF 1mM), y la mezcla de inhibidores de proteasas Complete mini (Roche) (una pastilla/10 ml buffer de lisis), con el fin de evitar la degradación de las proteínas durante el proceso de rotura celular. Cuando era necesario, se añadían inhibidores de fosfatasas. Una vez añadida la cantidad necesaria de tampón de lisis, habitualmente 150 μ l, se incorporaban perlas de vidrio de Ballotini de 0,45 mm (Braun Biotech) y se agitaba la mezcla en un aparato homogenizador de células Fast-Prep (Bio-101), a una intensidad de 5,5 durante 30 segundos. A continuación se separaban los extractos celulares de las perlas de vidrio y restos celulares mediante centrifugación refrigerada a 4°C y 13000 rpm durante 15-20 minutos. Se determinaba la cantidad de proteína solubilizada en los extractos midiendo la absorbancia a 280 nm de una dilución de los mismos en un espectrofotómetro Beckman DV 640 (1 unidad de densidad óptica corresponde aproximadamente a 1,5 mg/ml de proteína). Se igualaba la cantidad de proteína en todas las muestras, aumentando el volumen si era necesario con tampón de lisis. A los extractos ya equilibrados se les añadía tampón de carga SDS-PAGE 2 \times (125 mM Tris HCl pH 6,8, SDS 5%, 25% glicerol, azul de bromofenol; se añade 1/5 del volumen final de DTT 1 M justo antes de usar) y se hervían durante 5 minutos para su desnaturalización. A continuación, las muestras podían utilizarse para la electroforesis o conservarse a -20 °C para su posterior utilización.

6.2. Electroforesis de proteínas

Para la separación de las proteínas del extracto se utilizó geles de poliacrilamida al 8% o 10%, en condiciones desnaturalizantes, con SDS. Se realizaba en cubetas Mini-Protean II Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 150-180 voltios. Se utilizaba un tampón de electroforesis con la siguiente composición: 3,028 g/l Tris, 14,46 g/l glicina y 1 g/l de SDS. Como patrón de pesos moleculares se empleaba el suministrado por Invitrogen.

6.3. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Una vez separadas las proteínas en el gel de poliacrilamida, se transferían desde el gel a membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham), y como protectores y absorbentes se utilizaba papel Whatman 3MM Chr. Se transfería en unas cubetas de transferencia Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 100 voltios durante 1 hora. El tampón de transferencia empleado se componía de 5,8 g/l Tris, 2,9 g/l glicina y 0,37 g/l de SDS) al cual se le añadía un 20% del volumen final de metanol o etanol justo antes de su utilización.

6.4. Inmunodetección (*Western-blotting*)

Una vez obtenidas las membranas tras la transferencia, éstas eran bloqueadas con leche desnatada en polvo al 5% durante 30 minutos en tampón TTBS (29,2 g/l, 24,2 g/l de Tris pH 7,5 y 500 µl/l de Tween20). Posteriormente, las membranas eran incubadas con el anticuerpo primario correspondiente en presencia de leche al 1% en TTBS durante hora y media a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4 °C. Se realizaban lavados con TTBS durante 30 minutos cambiando éste cada 5-10 minutos. El anticuerpo primario se detectaba utilizando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa que se incubaba en leche al 1 % disuelta en TTBS durante 45 minutos a temperatura ambiente. El sistema de detección utilizado para el revelado era el ECL (Amersham).

En ocasiones las membranas eran deshibridadas mediante la adición de tampón de deshibridación (7,5 g/l glicina, a 5 ml/l de NP40, 1% SDS y pH ajustado a 2,2 con HCl) durante una hora, y posteriormente se comenzaba con el bloqueo de la membrana con leche al 5% en tampón TTBS.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron:

Anticuerpo	Proteína que reconoce	Dilución de trabajo	Origen	Procedencia
Anti-Myc (9E10)	c-myc	1:2000	Ratón	BAbCO
Anti-Slt2	MAPK Slt2	1:2000	Conejo	Dr.H.Martín
Anti-P-p44/42	MAPK fosforilada en TEY	1:2000	Conejo	Cell signaling
Anti-β-actina	β-actina	1:2000	Ratón	Sigma
Anti-IgG conejo conjugado peroxidasa	Anticuerpo primario de conejo	1:3000	Burro	Amersham Pharmacia Biotech
Anti-IgG ratón conjugado peroxidasa	Anticuerpo primario de ratón	1:3000	Oveja	Amersham Pharmacia Biotech

7. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GST Y GST-MSG5 EN *E. Coli*

E. coli (BL21) se transformó con los plásmidos pGEX-KG o pGEX-MSG5 o pGEX-MSG5^{C319A}. Los transformantes se cultivaban en LB ampicilina durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se refrescaba el cultivo y una vez alcanzada una DO₆₀₀ de 0.5, se les añadía IPTG a una concentración final de 0.4 mM y se incubaban durante 3 horas para inducir la producción de las proteínas.

Una vez recogidas las células, se rompieron por sonicación, para lo que previamente se resuspendieron en 2,5 ml de un tampón de resuspensión (50 mM Tris-HCl pH-8, 820 g/l de sacarosa, 10 mM EDTA pH-8) al que se añadieron inhibidores de proteasas, se mantuvieron 15 minutos en hielo y posteriormente se añadieron 10 ml de tampón de lisis (50 mM Tris HCl pH-8, 1mM EDTA, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,1% NP40, lisozima 0,125 mg/ml e inhibidores de proteasas). Tras incubar en hielo durante 10 minutos, las células se rompieron mediante 3 ciclos de sonicación durante 30 segundos, se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 30 minutos y se separó el sobrenadante con el extracto proteico. Para la purificación de las proteínas fusionadas a GST, se añadieron 250 µl de una matriz de sefarosa con glutation adsorbido (Pharmacia Biotech) al 50% (lavadas previamente en una solución 2,38 mg/ml HEPES y 0,1 mM DTT) y se incubó durante 2 horas en agitación a 4°C. Posteriormente se hicieron 3 lavados sobre la matriz con tampón de lavado (50 mM MOPS pH-7,2, 2,03 g/l CIMg, 0,198 g/l MnCl y glicerol 10%) y se procedió a la elución de las proteínas añadiendo 150 µl de un tampón de elución que contenía 10 mM de glutation reducido y 10 mM de DTT en el tampón de lavado empleado anteriormente, y ajustando el pH a 9 con NaOH. Tras mantener en agitación en frío durante 1 hora, se centrifugó y se recogió el sobrenadante, que contenía las proteínas en fusión a GST. Para comprobar la cantidad y pureza de la proteína purificada, se separaban 10 ml de estos extractos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, y las proteínas se visualizaban directamente sobre el gel mediante la tinción con azul de Coomassie y posterior destinción con una solución de metanol al 40%.

8. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN A MYC EN *S. cerevisiae*

Las cepas de levadura se cultivaban hasta fase exponencial (DO≈0.6) y se recogían como se ha explicado anteriormente. Se rompían las células recogidas con el tampón de lisis al que nos referimos en el apartado 6.1. También se le añadían en el momento de la utilización, los inhibidores de proteasas: fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF 1mM), y la mezcla de inhibidores de proteasas Complete mini (Roche) (una pastilla/10 ml buffer de lisis), con el fin de evitar la degradación de las proteínas.

Una vez igualada la cantidad de proteína de todos los extractos proteicos obtenidos, se tomaba una pequeña muestra, para emplearla como control de extractos sin purificar, y se

procesaba con el tampón de carga e hirviéndola como se ha descrito anteriormente. El resto de muestra (unos 150 μ l a una concentración de 50 μ g/ μ l) se incubaba durante 1 hora y media con 1 μ l de anticuerpo anti-myc manteniéndolas en hielo y agitando de vez en cuando. Posteriormente, se añadían 40 μ l de *GammaBind Plus Sepharose* (Pharmacia Biotech) al 50% en tampón de lisis (previamente lavada primero con Tris 50 mM pH 7.5 y luego con tampón de lisis). Se incubaba en agitación a 4°C durante dos horas. Posteriormente, para ensayos de copurificación, se realizaban lavados con tampón de lisis y finalmente se eluía la muestra hirviéndola en tampón de carga 2X de SDS-PAGE como en casos anteriores. En caso de querer realizar alguna reacción enzimática se lavaba primero con tampón de lisis y luego con el tampón adecuado a la reacción, quedando la proteína lista para su utilización.

9. ENSAYO QUINASA *IN VITRO*

En el ensayo realizado se utilizó Slt2myc como enzima y GST-Msg5^{C319A} como sustrato. Se obtuvieron las células de *E. coli* que expresaban la proteína de fusión GST-Msg5^{C319A} y se purificó esta proteína de fusión tal y como se ha explicado en el apartado 7. Se purificó Slt2myc con *GammaBind Sepharose* como se ha descrito anteriormente en el apartado 8, aunque en este caso el buffer de lisis utilizado era específico para este ensayo, el buffer IPK: Tris 50 mM pH 7.5, 5% de glicerol, 5mM EDTA, 5 mM EGTA, 100 mM NaCl, 0.1% NP40, 10 mM NaF, 1 mM ortovanadato sódico, 15 mM pirofosfato sódico, 15 mM p-nitrofenilfosfato, leupeptina, pepstatina A, antipaína y aprotinina, todos ellos a 25 μ g/ml, y 1 mM PMSF.

Una vez purificada la proteína se lavaba 3 veces con IPK y una con el tampón quinasa compuesto por 25 mM MOPS pH7.5, 1mM EGTA, 1mM MgCl₂, 1mM ortovanadato sódico, y 50 mM β -glicerofosfato. Una vez lavado, la matriz con Slt2myc inmunoprecipitado se resuspendía en 20 μ l de tampón quinasa, del cual se separaba una quinta parte para comprobar la cantidad de proteína Slt2myc inmunoprecipitada. Se añadían 3 μ l de la proteína recombinante GST-Msg5^{C319A} a la matriz y se mantenía durante 3 minutos a 30°C. Comenzaba la reacción tras la adición de una mezcla de reacción que consistía en 0.6 μ l por muestra de una solución madre de ATP frío 1mM (para que quede a una concentración final de 30 μ M en la reacción del ensayo quinasa) y 1 μ l de ³²P γ -ATP por muestra a una concentración de 10 μ Ci/ml en tampón quinasa. La reacción se incubaba 30 minutos a 30°C y se paraba con la adición de 10 μ l de tampón de carga de SDS-PAGE 2X. Las proteínas se separaban por electroforesis y el gel se fijaba con 10% metanol-10% ácido acético. Se secaba el gel y se autorradiografiaba.

10. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS *IN VIVO*: SISTEMA DE DOS HÍBRIDOS

10.1. Sistema de dos híbridos en células haploides basado en pGBT9 y pGAD424

Para la detección de interacción entre dos proteínas mediante este sistema, uno de los genes era subclonado en el vector pGBT9 en fase con el dominio de unión a DNA (BD por *binding domain*) del gen *GAL4* y bajo el control del promotor *ADH1*. El otro gen objeto de estudio se subclonaba en el vector pGAD424 en fase con el dominio activador de transcripción de *GAL4* (AD por *activation domain*), bajo el control del mismo promotor. El gen reportero *lacZ* se encuentra controlado por el promotor del gen *GAL1*, al que se une al factor de transcripción Gal4. La cepa utilizada para el sistema es la Y190 que contiene integrada en su genoma la construcción *GAL1-lacZ*. Además, en esta cepa, la expresión de *HIS3* también está regulada por la unión del factor de transcripción Gal4 al promotor del gen *GAL1*.

La cepa de *S. cerevisiae* se cotransformaba con los plásmidos correspondientes. Se seleccionaban los clones positivos por crecimiento en un medio selectivo carente de leucina (marcador del vector pGAD424) y triptófano (marcador del vector pGBT9). Posteriormente, se observaba la existencia de interacción o no mediante valoración cualitativa o cuantitativa. Los protocolos empleados para dicha valoración fueron los siguientes:

10.1.1. Valoración cualitativa de la interacción

Se escogían varios clones de transformantes y se sembraban en placas de medio selectivo Trp⁻ Leu⁻ durante 48 horas a 30°C. Posteriormente, se seleccionaban alguno de estos clones, y se crecían en medio mínimo selectivo durante toda la noche. Posteriormente se sembraban mediante gotas en un medio carente de leucina, triptófano e histidina, y suplementado con 3-aminotriazol. Estas placas se incubaban a 30°C hasta que se observaba crecimiento en este medio como consecuencia de la interacción positiva entre proteínas.

10.1.2. Valoración cuantitativa de actividad β -galactosidasa

Se inoculaban los transformantes seleccionados en tubos con medio líquido selectivo Trp⁻ Leu⁻ durante toda la noche. Se refrescaban a la mañana siguiente en un volumen final de 5 ml de cada cultivo y se dejaban crecer hasta fase exponencial ($DO \approx 0.6$). Posteriormente se recogían las células y se rompían las células tal y como se ha descrito en el apartado 6.1 empleando un tampón de lisis que consistía en 100mM Tris-HCl pH8, 1mM DTT, 20% de glicerol, y 2mM PMSF, y se medía la cantidad de proteína obtenida. Para realizar el ensayo se añadían 10-100 μ l del extracto proteico en 900 μ l de tampón Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄) con β -mercaptoetanol (2,7ml/l) y se ajustaba el volumen

a 1 ml con tampón de lisis. La mezcla de reacción se incubaba 5 minutos a 28°C. Posteriormente, se iniciaba la reacción añadiendo 200 µl de ONPG (disuelto en tampón Z a concentración 4 mg/ml) y se incubaba a 28°C hasta la aparición de coloración amarilla. La reacción se paraba con la adición de 500 µl de Na₂CO₃ 1M.

El resultado se expresó en unidades de actividad específica β-Galactosidasa, que se calculaban de la siguiente manera:

$$\text{DO420} \times 1.7$$

$$0.0045 \times \text{proteína ensayada (mg/ml)} \times \text{volumen ensayado (ml)} \times \text{tiempo de incubación (min)}$$

10.2. Sistema de dos híbridos en células diploides basado en pGBKT7 y pGADT7

Para la identificación de interacciones entre proteínas *in vivo* en la levadura *S. cerevisiae* utilizamos mayoritariamente el sistema de doble híbrido MATCHMAKER de Clontech también basado en el factor de transcripción Gal4. En este caso, uno de los genes era subclonado en el vector pGBK-T7 en fase con el dominio de unión a DNA del gen *GAL4* y bajo el control del promotor *ADHI*. El otro gen objeto de estudio se subclonaba en el vector pGAD-T7 en fase con el dominio activador de transcripción de *GAL4*, bajo el control del mismo promotor.

Es necesario que ambas proteínas híbridas se expresen de forma simultánea en la misma levadura; para ello cada uno de los plásmidos se transformaba en dos cepas de tipo sexual opuesto; es decir, pGBK-T7 en la cepa PJ69-4A y pGAD-T7 en la cepa PJ69-4α. Después se inducía el apareamiento entre ellas tras incubar conjuntamente ambas cepas a 30°C en medio líquido rico YPD, durante toda la noche. Posteriormente, se seleccionaban aquellas células diploides que expresaban ambas proteínas de interés tras plaquear 50 µl de este cultivo en un medio selectivo carente de leucina (marcador del vector pGAD-T7) y triptófano (marcador del vector pGBK-T7).

La cepa utilizada en este sistema posee como genes testigo *HIS3*, *ADE2* y *lacZ*; la expresión de cada uno de ellos está regulada bajo el control de diferentes promotores para el factor de transcripción Gal4, lo cual reduce la incidencia de falsos positivos, puesto que sólo las interacciones específicas consiguen activar la expresión de todos estos genes dependientes de GAL4 de forma simultánea.

10.2.1. Valoración cualitativa de la interacción

Primero se seleccionaba uno de los diploides en medio selectivo Leu⁻ Trp⁻ y se valoraba cualitativamente la interacción mediante una selección nutricional tras cultivar las células que expresaban ambas proteínas híbridas en un medio mínimo carente además de histidina y/o adenina. La expresión de los genes reporteros *HIS3* y *ADE2* de esta cepa se activa por el factor

de transcripción Gal4. Estas placas se incubaron a 30°C hasta que se observaba crecimiento en este medio selectivo como consecuencia de la interacción positiva entre proteínas.

10.2.2. Valoración cuantitativa de actividad β -galactosidasa

Para cuantificar la interacción entre ambas proteínas, se analizaba la expresión del marcador de la actividad β -galactosidasa por la expresión del gen *lacZ* también regulado por el factor de transcripción Gal4. El protocolo empleado para dicha valoración fue el siguiente:

Se inoculaban los diploides seleccionados en un medio líquido selectivo. A la mañana siguiente 300 μ l de este cultivo se refrescaban en 3 ml de YPDA (medio rico suplementado con adenina) y se dejaban crecer durante 3 o 4 horas hasta que estén en fase de crecimiento exponencial y se determinaba la DO_{600} del cultivo. En este punto, se recogían las células por centrifugación en un tubo eppendorf, y posteriormente se hacía un lavado con el tampón Z (16.1 g/l $Na_2PO_4 \cdot 7H_2O$, 5.5 g/l NaH_2PO_4 , 0.75g/l KCl, 0.246 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) con β -mercaptoetanol (2.7 ml/l), para resuspenderlo posteriormente en 150 μ l de este tampón. La rotura de las células se hacía mediante 3 ciclos de congelación-descongelación en un baño de nitrógeno líquido y en otro conteniendo agua a 37°C, dejando las células durante un máximo de 5 minutos en cada uno de los baños. Posteriormente se añadía a cada tubo con las células rotas 810 μ l de la mezcla del tampón Z con β -mercaptoetanol (2,7ml/l) y con 4 mg/ml de ONPG. Se incubaban todas las reacciones a 30°C hasta aparición de color amarillo y se paraba la reacción con 400 μ l de Na_2CO_3 1M. A continuación se separaban las células mediante centrifugación y se medía la absorbancia del sobrenadante a 415 nm. Las unidades de β -galactosidasa se calculaban de la siguiente forma:

$$DO_{415} \times 1000$$

$$\text{tiempo de incubación (min)} \times OD_{600}$$

11. MICROSCOPIA

Las imágenes de *S. cerevisiae* se obtuvieron tras la observación en un microscopio Nikon Optiphot. Las imágenes digitales fueron adquiridas a través de una cámara Hamamatsu Orca C4742-95-12ER acoplada al microscopio. El software empleado para la captación y procesamiento de las imágenes fue Aquacosmos Imaging Systems.

Resultados

1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE *S. cerevisiae* EN AUSENCIA DE Msg5

1.1. El análisis transcriptómico global en mutantes *msg5Δ* mediante microarrays de DNA muestra inducción transcripcional de genes regulados por la ruta de apareamiento y de integridad celular

Como se ha comentado en la introducción, Msg5 es una fosfatasa de especificidad dual que regula negativamente los niveles de fosforilación de las MAPKs Fus3 y Slt2, tanto en ausencia como en presencia del estímulo que activa la ruta de transducción de señal en la que cada una de estas MAPKs participa (Andersson *et al.*, 2004; Doi *et al.*, 1994; Flandez *et al.*, 2004). No existen sin embargo estudios acerca la importancia funcional de Msg5 en las respuestas mediadas por estas MAPKs, ni tampoco se conocen otras posibles funciones ajenas a la que ejerce sobre las MAPKs que regula. Todo ello hizo que el primer objetivo de este trabajo se centrara en estudiar aspectos relacionados con la funcionalidad de esta fosfatasa aún por definir.

Con este fin se analizó el impacto global de la actividad de Msg5 en el transcriptoma de *S. cerevisiae*, mediante el uso de *microarrays* de DNA y de una cepa mutante *msg5Δ* y su correspondiente cepa silvestre isogénica. De esta forma conoceríamos el efecto que provoca su ausencia en la respuesta transcripcional global en condiciones de crecimiento vegetativo. Para este análisis se utilizó como fondo genético la cepa BY4741 por haber sido previamente utilizada en otros análisis transcriptómicos (García *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2000), de manera que los datos obtenidos posteriormente pudieran ser comparados con los ya descritos.

En primer lugar se confirmó el efecto que Msg5 ejerce sobre la activación de las MAPKs Slt2 y Fus3, analizando mediante *Western blotting* los niveles de fosforilación de ambas MAPKs en ausencia de esta fosfatasa (BY4741*msg5Δ*). La fosforilación de estas MAPKs se puede detectar fácilmente mediante el uso de anticuerpos comerciales anti-fosfo-p44/42 MAPK que reconocen la forma doblemente fosforilada, y por tanto activa de las MAPKs Slt2, Fus3 y Kss1. Las cepas BY4741*slt2Δ*, BY4741*fus3Δ* y BY4741*kss1Δ* se cultivaron en presencia de feromona para facilitar la identificación de las bandas correspondientes a cada una de las MAPKs. Comprobamos en la **figura 14** que las células carentes de Msg5 muestran mayores niveles de fosforilación de Slt2 y Fus3 que las células silvestres. Sin embargo, los niveles de fosforilación de la MAPK Kss1 en la cepa *msg5Δ* son similares a los obtenidos en la cepa silvestre. Estos datos confirmaban el papel ya establecido de Msg5 como regulador negativo de las MAPKs de la ruta de apareamiento y de integridad celular (Andersson *et al.*, 2004; Flandez *et al.*, 2004).

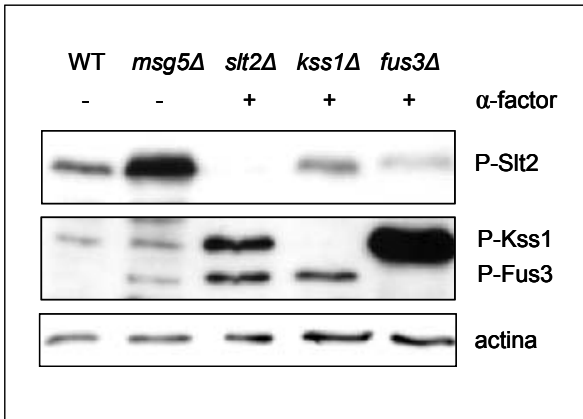


Figura 14. Efecto de la ausencia de Msg5 sobre la fosforilación de las MAPKs Slt2, Kss1 y Fus3. Análisis mediante *Western blotting* de los extractos proteicos procedentes de las cepas isogénicas BY4741 (silvestre, WT) e Y07373 (*msg5Δ*), creciendo en medio rico (YPD) a 24°C y de las cepas control Y00993 (*slt2Δ*), Y06981 (*kss1Δ*) e Y03042 (*fus3Δ*) tratadas con α -factor 40 μ M durante 90 minutos para identificar las bandas correspondientes a cada una de las MAPKs. La membrana se incubó con anticuerpos anti-fosfo-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, fosfo-Fus3 y fosfo-Kss1 y anti-actina como control de carga.

Una vez confirmado el papel de Msg5 sobre la activación de las MAPKs, se realizó un análisis a gran escala del transcriptoma en células carentes de Msg5 y en células silvestres durante crecimiento vegetativo a 24°C mediante el uso de *microarrays* de DNA. Se comparó así la abundancia relativa de los mRNA en ambas situaciones. La metodología de este estudio incluyó extracción del mRNA, la obtención y el marcaje de los cDNAs, la hibridación de los *microarrays*, así como el análisis de imagen y tratamiento de datos obtenidos. El conjunto de los genes cuya expresión cambiaba en la cepa mutante respecto a la silvestre se muestra en la **tabla 2**; estos genes se clasificaron en familias funcionales de acuerdo con las bases de datos YPD y SGD.

Los resultados mostrados en la **tabla 2** indican que en ausencia de Msg5, 46 genes aumentaban su expresión presentando ratios de inducción *msg5Δ*/wt por encima de 1.8, mientras que ningún gen fue reprimido más de 0,55 veces en este mutante con respecto a las células silvestres.

Tabla 2. Clasificación funcional de los ORFs cuyos transcritos se inducen al menos 1.8 veces en mutantes *msg5Δ*. Los valores mostrados corresponden al valor medio de inducción en mutantes *msg5Δ* versus células silvestres. Las categorías funcionales fueron asignadas según la información que se encuentra en la base de datos SGD y YPD Proteome Bionknowledge® Library.

ORF	GEN	<i>msg5Δ</i> /WT	FUNCIÓN
Apareamiento			
YBR040W	<i>FIG1</i>	10,06	Proteína implicada en fusión celular
YCR089W	<i>FIG2</i>	7,04	Proteína implicada en apareamiento
YNR044W	<i>AGA1</i>	4,05	Proteína implicada en la adhesión celular

YML047C	<i>PRM6</i>	3,88	Proteína de membrana regulada por feromona
YJL170C	<i>ASG7</i>	3,65	Inhibe una respuesta inapropiada a feromona por regulación de la localización de Ste4p
YNL279W	<i>PRM1</i>	3,53	Proteína implicada en la adhesión celular
YPL192C	<i>PRM3</i>	2,84	Proteína regulada por feromona, necesaria para la cariogamia, que se localiza en la membrana interna nuclear.
YIL117C	<i>PRM5</i>	2,83	Proteína regulada transcripcionalmente por estrés celular, feromona e integridad celular
YDR085C	<i>AFR1</i>	2,40	Proteína implicada en la proyección de apareamiento
YGL032C	<i>AGA2</i>	2,40	Subunidad de unión de la a-aglutinina
YJR004C	<i>SAG1</i>	2,25	alfa-aglutinina implicada en las interacciones entre células durante el apareamiento
YDR461W	<i>MFA1</i>	2,04	Feromona a-factor de apareamiento
YCL055W	<i>KAR4</i>	1,84	Proteína regulatoria necesaria para la inducción de genes de la cariogamia por feromona
Pared celular			
YLR194C		2,28	Proteína con anclaje GPI implicada en la función de pared celular
YER150W	<i>SPI1</i>	2,24	Proteína con anclaje GPI implicada en la función de pared celular
YDR077W	<i>SED1</i>	1,99	Proteína con anclaje GPI implicada en la función de pared celular
YKL096W	<i>CWP1</i>	1,92	Proteína con anclaje GPI implicada en la función de pared celular
YLR120C	<i>YPS1</i>	1,80	Proteína con anclaje GPI implicada en la función de pared celular
Transducción de señales			
YHR030C	<i>SLT2</i>	2,67	MAP quinasa implicada en la ruta de integridad celular
YKL161C	<i>MLP1</i>	2,15	Serín/treonín proteín quinasa con similitud a MAP quinasas
YMR104C	<i>YPK2</i>	1,95	Serín/treonín proteín quinasa con similitud a Ypk1
YOR208W	<i>PTP2</i>	1,86	Proteín tirosín fosfatasa (PTP)
YOL016C	<i>CMK2</i>	1,84	Serín/treonín proteín quinasa dependiente de Ca/calmodulina
Metabolismo			
YOL058W	<i>ARG1</i>	2,72	Arginosuccinato sintasa
YHR209W		2,54	Posible metiltransferasa
YPL088W		2,39	Posible aril deshidrogenasa
YDL037C	<i>BSC1</i>	2,06	Proteína con similitud a la glucan 1,4-alfa-glucosidasa
YJR109C	<i>CPA2</i>	1,96	Carbamoilfosfato sintasa de la ruta de biosíntesis de arginina
YDR074W	<i>TPS2</i>	1,92	Trealosa-6-fofato-fosfatasa del metabolismo de glucosa y fructosa
YML100W	<i>TSL1</i>	1,88	Componente regulatorio del complejo trealosa-6-fofato sintasa
Respuesta a estrés			
YGR142W	<i>BTN2</i>	2,53	Proteína con papel en la homeostasis celular
YCR021C	<i>HSP30</i>	2,30	Proteína de choque térmico con papel en la homeostasis celular
YBR169C	<i>SSE2</i>	2,20	Factor de intercambio de nucleótidos para Ssa1
Transcripción			
YLR014C	<i>PPR1</i>	2,52	Factor de transcripción de la ruta de regulación de pirimidina
YDL048C	<i>STP4</i>	2,18	Posible factor de transcripción implicado en la regulación de genes que codifican amino permeasas
Transporte			
YHL036W	<i>MUP3</i>	2,40	Metionín permeasa de baja afinidad
YDL234C	<i>GYP7</i>	2,00	Proteína activadora de GTPasa para Ypt7
YPR157W		1,90	Ruta del tráfico vacuolar
Otros			
YIL080W		4,48	Transposición del elemento Ty
YGR250C		2,07	Posible proteína de unión a RNA

Desconocida

YML048W-A		2,34	Proteína de función desconocida
YJL144W		2,06	Proteína de función desconocida
YOR385W		1,81	Proteína con baja similitud a Dis1p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , implicada en el crecimiento invasivo
YIL082W		7,82	Proteína que contiene y puede unirse a RNA o DNA
YGR146C		1,94	Proteína de función desconocida
YGR161C	RTS3	1,90	Proteína de función desconocida

El perfil transcripcional global de la respuesta generada en ausencia de Msg5, indica que el grupo funcional más significativo corresponde al relacionado con el apareamiento, el cual incluye los genes con mayores niveles de expresión (*FIG1*, *FIG2* y *AGA1*). Adicionalmente, se observa la presencia de otros grupos funcionales de genes relacionados con la construcción de la pared celular (que codifican proteínas con anclajes GPI) o con la transducción de señales. Asimismo se inducen genes de otros grupos funcionales relacionados con la transcripción, transporte, respuesta a estrés, e incluso con el metabolismo de aminoácidos. Asimismo, aparecen genes de función desconocida.

En la **figura 15** se agrupan los patrones de expresión de los genes inducidos en ausencia de Msg5 y en condiciones distintas estudiadas en otros trabajos y que activan la ruta de integridad celular o la de apareamiento. Utilizando la base de datos YEASTRACT (basada en referencias bibliográficas), se llevó a cabo la búsqueda de posibles factores de transcripción implicados en la regulación transcripcional de los genes de diferentes grupos. Aparecen así también en esta tabla, asociaciones transcripcionales documentadas mediante análisis de tipo *ChIP-on-chip* de algunos de estos genes con los factores de transcripción Ste12 y Tec1.

Como se observa en la **figura 15**, 33 de los 46 genes que mostraron inducción transcripcional en ausencia de Msg5, están regulados transcripcionalmente por la ruta de apareamiento tras estimulación con feromona (Roberts *et al.*, 2000); 2 de ellos aparecen marcados con un asterisco, haciendo referencia a que se ha observado inducción por feromona en los trabajos de (Terrance & Lipke, 1987; Bardwell *et al.*, 1994). Sin embargo, tan sólo 13 de estos 46 genes sobreexpresados se inducen transcripcionalmente en condiciones que activan la ruta de integridad celular, como en presencia de rojo Congo o zimoliasa (Garcia *et al.*, 2004) ó por la sobreexpresión de un alelo hiperactivo *PKC1^{R398A}* (Roberts *et al.*, 2000). También observamos que algunos de ellos, 19 y 13 genes, muestran asociación con los factores de transcripción Ste12 y Tec1 respectivamente.

Aparecen además genes de los cuales no se han descrito inducción en respuesta a la activación de Fus3 o Slt2. Se trata de 11 genes con funciones relacionados con el metabolismo, procesos de transcripción y de transporte. Tres de ellos (*PPR1*, *YGR250C* y *TSL1*) tienen en su secuencia promotora regiones de unión al factor de transcripción Ste12 que actúa en la ruta de apareamiento, tal y como se refleja en la base de datos YEASTRACT obtenido de un análisis de

ChIP-on-chip. También encontramos un grupo de 4 genes (*STP4*, *MUP3*, *CPA2* Y *ARG1*) implicados en el metabolismo de aminoácidos. La aplicación de la herramienta informática Genecodis nos permite asignar un determinado nivel de significación estadística para cada grupo funcional representado en el grupo de interés (en nuestro caso genes activados en células carentes de *Msg5*), tomando como referencia la probabilidad de encontrar esa asociación al azar a nivel genómico. Según este análisis resulta significativa la respuesta relacionada con el metabolismo de aminoácidos generada en ausencia de *Msg5*.

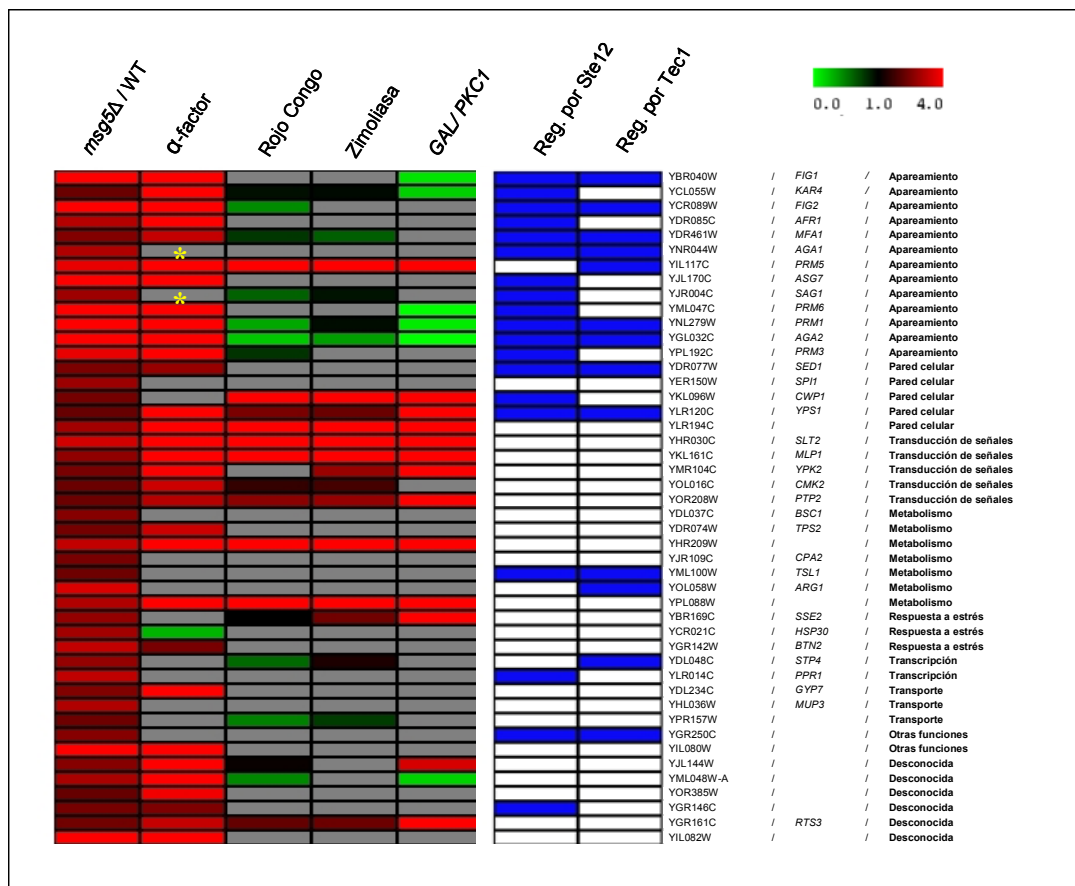


Figura 15. Comparación de la respuesta transcripcional de mutantes *msg5Δ* con la observada en distintas condiciones de activación de MAPKs A. Agrupación jerárquica de los perfiles de expresión génica de *S. cerevisiae* en mutantes *msg5Δ* (Y07373, derivado de la BY4741), en cepas silvestres tras estimulación con factor alfa (50nM, 90 minutos) (Roberts *et al.*, 2000), rojo Congo (30 μ g/ml, 4 horas), zimoliasa (5 unidades/ml, 2h) (García *et al.*, 2004) y sobreexpresando el alelo hiperactivo *PKC1*^{R398A} (Roberts *et al.*, 2000). En cada columna aparecen representadas las distintas condiciones comparadas según aparece indicado. Cada fila representa los ratios de expresión de un gen (en gradiente de color) en cada una de las condiciones enumeradas. En rojo se representa la inducción y en verde la represión, tal y como se indica en la escala. Los cuadros grises indican ausencia de datos. Los cuadros azules indican asociación transcripcional documentada (YEASTRACT) del gen con los factores de transcripción indicados. Los asteriscos representan inducción por feromona no descrita por Roberts (2000), pero sí por otros autores (Terrance & Lipke, 1987; Bardwell *et al.*, 1994). Las categorías funcionales fueron asignadas según la información que se encuentra en la base de datos YPD y SGD.

1.2. Confirmación del perfil transcripcional del mutante *msg5Δ* mediante ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real

Con el fin de validar los resultados obtenidos mediante la técnica de *microarrays* de DNA se utilizó una segunda aproximación metodológica, empleando RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Basándonos en los resultados obtenidos en los experimentos de *microarrays*, se eligieron cinco de los genes con mayores valores de inducción en ausencia de Msg5. Estos ensayos se hicieron utilizando los mismos mRNAs que se usaron en los experimentos de *microarrays*. Los resultados obtenidos con ambas aproximaciones experimentales (**figura 16**), muestran una buena correlación, confirmando los resultados de inducción de estos genes ensayados y por extensión de los demás, obtenidos mediante el uso de *microarrays* de DNA.

ORF	Gen	Ratio Microarray	Ratio Q-RT-PCR
<i>YJL170C</i>	<i>ASG7</i>	3.6	3.3
<i>YDR461 W</i>	<i>MFA1</i>	2.0	1.7
<i>YIL117C</i>	<i>PRM5</i>	2.8	3.3
<i>YOR208 W</i>	<i>PTP2</i>	1.9	1.8
<i>YBR040 W</i>	<i>FIG1</i>	10.0	11.7

Figura 16. Validación de los resultados de los *microarrays* mediante PCR cuantitativa. Análisis comparativo de expresión génica de un grupo de 5 genes seleccionados. Los valores corresponden a ratios de inducción de dichos genes en la cepa mutante *msg5Δ* respecto a la cepa silvestre de *S. cerevisiae* en condiciones basales, obtenidos mediante *microarrays* o PCR cuantitativa.

1.3. En ausencia de Msg5, la fosforilación de Slt2 aumenta pero no la activación del factor de transcripción Rlm1

Llama la atención el hecho de que, en ausencia de Msg5, se observa un elevado nivel de fosforilación de Slt2, mayor incluso que el de Fus3 (**figura 14**), y sin embargo, el análisis de los datos transcriptómicos (**figura 15**) revela una respuesta transcripcional dependiente de la ruta de integridad celular mediada por la MAPK Slt2 débil frente a la regulada por la ruta de apareamiento en la cual actúa Fus3. Esto nos llevó a profundizar en el estudio de expresión de estos genes en estas dos condiciones, en ausencia de Msg5 y tras estimulación de la ruta de integridad celular.

Para ello decidimos realizar un análisis comparativo tanto del número de genes inducidos, como de la intensidad de la inducción en ausencia de Msg5 y en situaciones de

activación de la ruta de integridad celular, como el tratamiento con rojo Congo, un compuesto que interfiere en la organización de la pared celular alterando fundamentalmente el ensamblaje de las cadenas de quitina. Para ello nos servimos de los datos publicados de un análisis a gran escala de la respuesta transcripcional frente a este tipo de agente, el cual muestra una buena representación de los genes que se activan de manera dependiente de la ruta mediada por Slt2 y de sus valores de inducción (Garcia *et al.*, 2004).

La plataforma empleada (*microarrays*) como el fondo genético de la cepa utilizado en nuestro análisis transcriptómico en mutantes *msg5Δ*, es el mismo que el empleado en el análisis transcripcional en células tratadas con rojo Congo; incluso las muestras se procesaron con idéntico protocolo en la Unidad de Genómica UCM/PCM. De esta forma, los datos derivados de ambos análisis podían ser comparados.

Como aparece en la **figura 17**, de los 57 genes que muestran inducción dependiente de Slt2 en presencia de rojo Congo (Garcia *et al.*, 2004), un bajo número, tan sólo 10, están inducidos en ausencia de *Msg5*; además la intensidad de esta inducción transcripcional es mucho menor a la observada en células silvestres en presencia de rojo Congo. Así, ninguno de los ratios de inducción transcripcional de estos genes en mutantes *msg5Δ* está por encima de 3, mientras que en presencia de este rojo Congo la mayoría de ellos superan este valor, llegando incluso a alcanzar valores de inducción transcripcional de 9,4 veces. Esto nos llevó a profundizar en el estudio de los mecanismos que subyacen a esta respuesta celular.

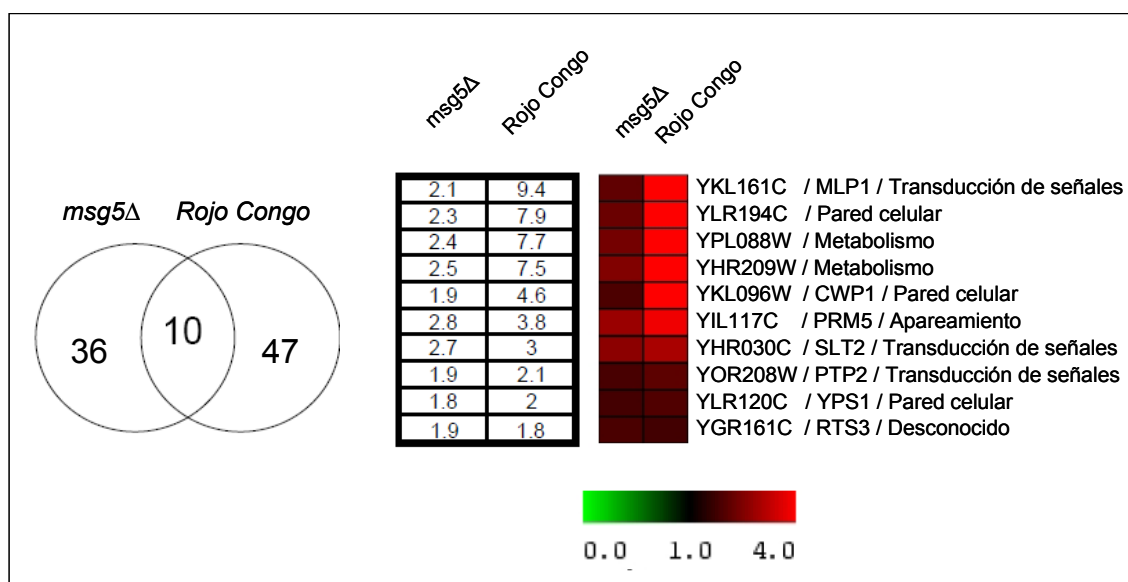


Figura 17. Comparación de los ratios de expresión de los 10 genes inducidos tanto en mutantes *msg5Δ* (Y07373) como en células silvestres (BY4741) tratadas con rojo Congo, obtenidos mediante *microarrays* de DNA.

La expresión de la gran mayoría de estos genes esta regulada por el factor de transcripción Rlm1 (Garcia *et al.*, 2004; Jung & Levin, 1999). Así que, nuestra primera aproximación para encontrar la causa de esta diferencia en la inducción génica, fue estudiar el nivel de activación de Slt2 y de su sustrato Rlm1 en ambas situaciones, en la cepa delecionada en *Msg5* y en la cepa silvestre tratada con rojo Congo.

Rlm1 es un factor de transcripción que es fosforilado por Slt2 tras la activación de la ruta de integridad celular. Este factor de transcripción, una vez fosforilado, regula la transcripción de una gran cantidad de genes así como su propia transcripción (Garcia *et al.*, 2004), de manera que su activación se detecta no sólo por un aumento en la proporción de proteína fosforilada, sino también por un aumento de la cantidad de proteína expresada. Para poder seguir su activación por fosforilación, detectable por una disminución de su movilidad electroforética, se llevó a cabo el marcaje del gen cromosómico *RLM1* con seis copias del epítipo myc en su zona carboxi-terminal. Para ello, se integró el plásmido pRS305-*RLM1myc* en el *locus* cromosómico del gen *RLM1* en la cepa silvestre (BY4741) así como en la mutante isogénica *msg5Δ* (Y07373).

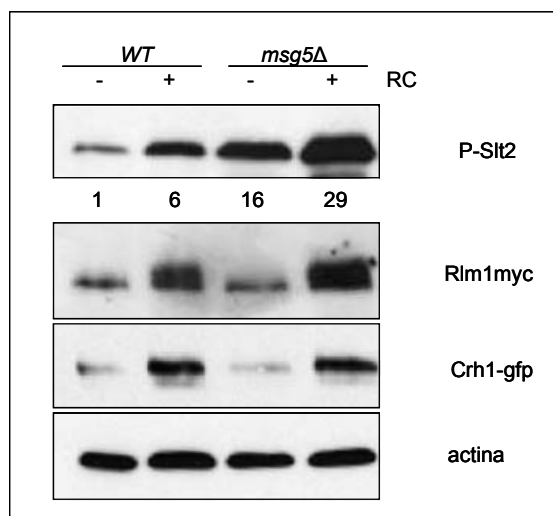


Figura 18. Efecto de la ausencia de *Msg5* sobre la actividad de *Slt2* *in vivo*. Las cepas YMM1 (silvestre Rlm1-myc) e YMM2 (*msg5Δ* Rlm1-myc), se transformaron con el plásmido pJV89GL que porta el gen *CRH1* en fusión a *GFP* (*CRH1-GFP*). Ambas cepas se cultivaron a 24°C en medio selectivo SD durante toda la noche. Posteriormente se refrescaron en medio rico (YPD) y una vez en fase exponencial se incubaron durante 2 horas a 24°C y de forma paralela en presencia de rojo Congo 30 µg/ml. Mediante *Western blotting* se analizaron los extractos proteicos procedentes de los lisados celulares utilizando anticuerpos anti-fosfo-p44/42, anti-myc, antiGFP y anti-actina para valorar los niveles de fosfo-Slt2, Rlm1myc, Crh1-GFP y de actina, respectivamente. Los números que aparecen debajo del panel correspondiente al anti-fosfo-Slt2 indican los niveles de fosforilación de Slt2 con respecto a la actina, y relativizados al valor de 1 en condiciones basales

Se estudió la activación de Slt2 y de Rlm1 en ambas cepas con Rlm1myc integrado (BY4741 y Y07373), en condiciones basales y en condiciones de activación de la ruta de integridad celular. Para ello las células fueron cultivadas durante 2 horas en presencia de rojo Congo 30µg/ml, y paralelamente, sin activación (24°C). A continuación se analizaron los lisados celulares obtenidos mediante *Western blotting* empleando anticuerpos anti-myc y anti-fosfo-p44/p42, que nos permiten estudiar la activación de ambas proteínas, Rlm1 y Slt2 respectivamente. Como se observa en la **figura 18**, en ausencia de estímulo, los niveles de fosforilación de Slt2 de la cepa silvestre son menores que los presentes en el mutante *msg5Δ*. Cuando ambas cepas (silvestre y *msg5Δ*) están en presencia de rojo Congo, la fosforilación de Slt2 aumenta. Asimismo, se induce un cambio de movilidad electroforética de una alta proporción de Rlm1 debido a su fosforilación, así como un aumento de la cantidad total de la proteína. La fosforilación de Slt2, detectada mediante anticuerpos anti-fosfo-p44/p42, así como la activación de Rlm1 tras adición de rojo Congo es mayor en células carentes de la proteína fosfatasa Msg5 que en células silvestres.

Sin embargo, al comparar la activación de ambas proteínas en ausencia de Msg5 a 24°C y en células silvestres tratadas con rojo Congo, observamos que mientras que el nivel de fosfo-Slt2 es similar o incluso superior en mutantes *msg5Δ* en condiciones basales, tanto el nivel de fosforilación como de expresión de Rlm1 son inferiores en la cepa *Δmsg5* a los que expresan las células silvestres expuestas a rojo Congo. Por tanto, en ausencia de Msg5 en condiciones de crecimiento vegetativo, la activación del factor de transcripción Rlm1 no muestra la correlación esperada con el nivel de fosforilación de Slt2. Esto explicaría el hecho de que el perfil de expresión en células carentes de Msg5 mostrasen tan escasa respuesta transcripcional dependiente de Rlm1 con respecto a las células silvestres en presencia de rojo Congo.

Con el fin de ampliar el estudio sobre la activación de la ruta de integridad celular en ambas situaciones, analizamos el nivel de expresión de *CRH1*, un gen que codifica una transglucosidasa importante en la remodelación de la pared celular cuya expresión se induce en respuesta a diversos tipos de estrés de pared celular (Garcia *et al.*, 2004; Jung & Levin, 1999; Lagorce *et al.*, 2003). Esta expresión depende íntegramente del factor de transcripción Rlm1 regulado por Slt2. Es por tanto considerado como un indicador válido de la activación de Rlm1 (Bermejo *et al.*, 2008). Para ello, ambas cepas BY4741 e Y07373 (*msg5Δ*) fueron transformadas con el plásmido centromérico que expresa la proteína de fusión Crh1-GFP. De esta forma pudimos analizar mediante *Western blotting* los niveles de expresión de esta proteína. Los mutantes *msg5Δ* muestran menores niveles de Crh1 que las células silvestres estimuladas con rojo Congo. Este dato coincide con la menor activación del factor de transcripción Rlm1 que regula su expresión, así como con la ausencia de inducción del gen *RLM1* en los datos obtenidos del análisis transcriptómico en mutantes *msg5Δ*.

El conjunto de resultados obtenidos hasta ahora indican que, en ausencia de esta fosfatasa, existe una falta de correlación entre la fosforilación de Slt2 y la activación de Rlm1 dependiente de esta MAPK.

1.4. En un mutante *msg5Δ*, Rlm1 no es el único sustrato frente al cual Slt2 presenta una actividad reducida

La siguiente cuestión que nos planteamos fue si la reducida actividad que manifiesta Slt2 en estos mutantes *msg5Δ* sólo afecta a Rlm1 o si también se manifestaba sobre otros sustratos de Slt2.

Está descrito por miembros de nuestro grupo de trabajo que, tras estimulación de la ruta de integridad celular, Slt2 retrofosforila a las MAPKKs de la ruta de integridad celular Mkk1 y Mkk2, y como consecuencia de ello, se detectan en SDS-PAGE bandas de menor movilidad electroforética (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2007). Así que elegimos la proteína Mkk1 como sustrato de la MAPK Slt2 para estudiar su fosforilación en células carentes de Msg5. En primer lugar transformamos tanto la cepa silvestre (YMM1) como la mutada en *MSG5* (YMM2) con el plásmido centromérico pRS416/*MKK1*-6myc que porta el ORF de *MKK1* bajo su propio promotor en fusión a seis copias del epítipo Myc (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2007). De manera semejante al experimento anterior, ambas cepas fueron cultivadas durante dos horas en presencia de rojo Congo 30µg/ml y de forma paralela sin activación a 24°C.

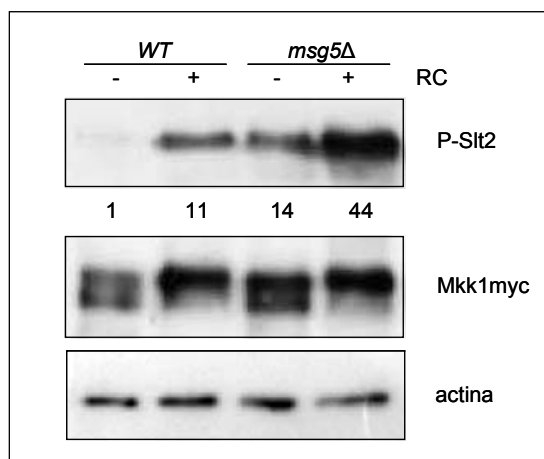


Figura 19. Efecto de la ausencia de Msg5 sobre la actividad de Slt2 *in vivo*. Las cepas YMM1 (silvestre-Rlm1myc) e YMM2 (*msg5Δ*-Rlm1myc) se transformaron con el plásmido pRS416-*MKK1*-6myc. Ambas cepas se cultivaron a 24°C en medio selectivo durante toda la noche. Posteriormente se refrescaron en medio rico (YPD) y una vez en fase exponencial se incubaron durante 2 horas a 24°C y paralelamente en presencia de rojo Congo 30µg/ml. Mediante *Western blotting* se analizaron los extractos proteicos utilizando anticuerpos anti-fosfo-p44/42, anti-myc y anti-actina para valorar los niveles de fosfo-Slt2, Mkk1myc, y de actina respectivamente. Los números que aparecen debajo del panel correspondiente al anti-fosfo-Slt2 indican los niveles de fosforilación de Slt2 con respecto a la actina, y relativizados al valor de 1 en condiciones basales

El análisis mediante *Western blotting* de los extractos obtenidos tras la lisis celular empleando anticuerpos capaces de reconocer el epítipo myc, nos permitió estudiar el cambio de movilidad electroforética de Mkk1 en las condiciones seleccionadas. Mediante el empleo de anticuerpos anti-fosfo-p44/p42 observamos que los niveles de fosforilación de Slt2 eran similares a los observados en el ensayo anterior. Como se puede observar en la **figura 19**, en presencia de rojo Congo, tanto en las células silvestres como en las que no expresan Msg5, tiene lugar un aumento de Slt2 fosforilado, y además se produce un cambio en la movilidad electroforética de Mkk1, consecuencia de la fosforilación ejercida por Slt2. Sin embargo, en ausencia de Msg5 en condiciones basales, aunque la fosforilación de Slt2 es similar a la que presentan las células silvestres estimuladas con rojo Congo, no se aprecia un aumento comparable en la fosforilación de Mkk1. Este resultado indica que el alto nivel de fosforilación de Slt2 observado en ausencia de Msg5 en condiciones basales tampoco conduce a un aumento proporcional de la fosforilación de Mkk1, otro de sus sustratos.

Por tanto, la reducida capacidad de activación de Slt2 en ausencia de Msg5 no es específica sobre el factor de transcripción Rlm1, sino que también afecta a otros sustratos sobre los que tiene capacidad de fosforilar, como Mkk1.

1.5. En mutantes *msg5Δ* en condiciones basales, Slt2 tiene su actividad quinasa reducida en ensayos *in vitro*

Con el fin de determinar si la reducida actividad mostrada por Slt2 *in vivo* en células carentes de Msg5 es consecuencia de la baja actividad catalítica de esta MAPK diseñamos un ensayo de fosforilación *in vitro*. En este ensayo empleamos como enzima la MAPK Slt2myc purificada por inmunoprecipitación de las cepas YMM3 (silvestre Slt2-6myc) e YMM4 (*msg5Δ* Slt2-6myc) en condiciones basales y de estimulación por rojo Congo 30μg/ml. Como hemos comentado en varias ocasiones, Msg5 es un sustrato susceptible de fosforilación por Slt2 tras estimulación de la ruta de integridad celular (Flandez *et al.*, 2004). Por ello, se utilizó como sustrato en el ensayo quinasa la versión catalíticamente inactiva GST-Msg5^{C319A} procedente de la purificación en *E. coli*, ya que así evitábamos que se produjese un proceso de autodesfosforilación de GST-Msg5^{C319A}. Como control negativo de la inmunoprecipitación de Slt2 utilizamos una cepa en la que no se produce la proteína de fusión Slt2myc (BY4741).

En el panel superior de la **figura 20** se muestra la autorradiografía con el resultado obtenido en el ensayo quinasa *in vitro*. Se observa una banda del tamaño esperado para GST-Msg5^{C319A} en el carril correspondiente a la reacción de Slt2myc procedente de la cepa silvestre tratada con rojo Congo, de mayor intensidad a la observada en esta misma cepa silvestre en ausencia de estimulación, consecuencia de una mayor fosforilación de Msg5^{C319A} por Slt2 en condiciones de estimulación. Esto encaja con los mayores niveles de fosfo-Slt2 observados en las muestras inmunoprecipitadas a partir de células tratadas con rojo Congo (panel intermedio de la figura 20) e indica un incremento en la actividad quinasa de Slt2 en estas condiciones.

Sin embargo, la fosforilación de $\text{Msg5}^{\text{C319A}}$ por Slt2myc procedente de células carentes de Msg5 en condiciones basales es menor que la observada en células silvestres estimuladas con rojo Congo, lo cual denota que la actividad quinasa de Slt2 en esta situación también es menor a pesar de los similares niveles de fosforilación de Slt2 en ambos inmunoprecipitados. Cuando los mutantes $\text{msg5}\Delta$ se tratan con rojo Congo, los niveles de fosforilación de Slt2 son los más altos, y en este caso, sí que se observa un aumento de la actividad quinasa de esta proteína.

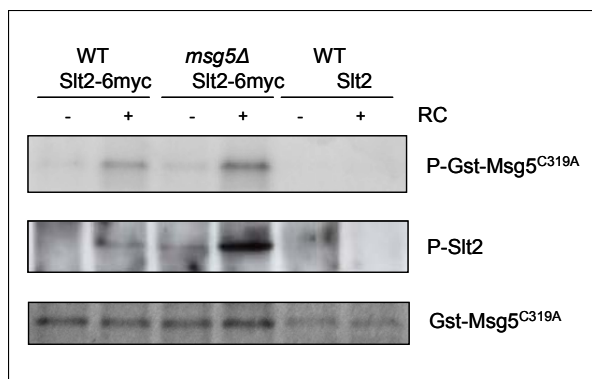


Figura 20. Efecto de la ausencia de Msg5 sobre la actividad de Slt2 *in vitro* sobre la proteína recombinante $\text{Msg5}^{\text{C319A}}$. Para producir el sustrato de la reacción *in vitro*, el vector $\text{PGEX-MSG5}^{\text{C319A}}$ se transformó en *E. coli*. Posteriormente se cultivó hasta fase exponencial y se indujo la expresión de la proteína $\text{Msg5}^{\text{C319A}}$ fusionada a GST mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,4 mM durante 4 horas. Se purificó posteriormente en una matriz de glutatión sefarosa. Las cepas YMM3 (silvestre Slt2-6myc), YMM4 (mutante $\text{msg5}\Delta$ Slt2-6myc) y BY4741 (silvestre) se cultivaron en medio rico (YPD) a 24°C y se trataron durante 2 horas con rojo Congo 30µg/ml. La proteína de fusión Slt2myc se obtuvo a partir de los correspondientes extractos celulares de éstas células mediante inmunoprecipitación. La reacción se llevó a cabo incubando $\text{GST-Msg5}^{\text{C319A}}$ purificado en *E. coli* con los inmunoprecipitados obtenidos de las cepas YMM3, YMM4 y BY4741 a 30°C, durante 30 minutos, en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Posteriormente las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se revelaron mediante autorradiografía (panel superior de la figura). El panel intermedio corresponde al análisis mediante *Western blotting* de los inmunoprecipitados mediante el uso de anticuerpos anti fosfo-p44/42. El panel inferior corresponde con la tinción del gel con azul de *Coomassie* como control de la cantidad de sustrato ($\text{Gst-Msg5}^{\text{C319A}}$) presente en cada una de las reacciones del ensayo quinasa.

Estos resultados concuerdan con los observados en el estudio de la actividad de Slt2 *in vivo*, y respalda la afirmación de que la fosforilación de Slt2 en ausencia de Msg5 en condiciones basales no conduce a una activación eficaz de esta MAPK. Esta reducida actividad catalítica además de manifestarse sobre el factor de transcripción Rlm1 y sobre Mkk1 *in vivo*, también se refleja sobre Msg5 *in vitro*.

1.6. En presencia de cafeína, la fosforilación de Slt2 no conduce a la activación del factor de transcripción Rlm1 , pero sí de otros sustratos de la MAPK

Está descrito que, en presencia de cafeína, compuesto que activa la ruta de integridad celular por un mecanismo todavía desconocido (Martin *et al.*, 2000), tampoco se observa

correlación entre los niveles de fosforilación de Slt2 y la inducción transcripcional dependiente del factor de transcripción Rlm1 (Kuranda *et al.*, 2006).

Así que nos planteamos estudiar si, como ocurría en el caso de los mutantes *msg5Δ* en ausencia de estimulación, la falta de inducción transcripcional dependiente de Rlm1 en respuesta a cafeína era debida a un defecto en la activación de este factor de transcripción. Para ello, un cultivo de células silvestres (YMM1) transformadas con el plásmido que expresa Crh1-GFP fue tratado con cafeína 12 mM durante dos horas y paralelamente incubado a 24°C como control de activación basal. También estimulamos las células con rojo Congo (30 µg/ml) durante dos horas para tener un control positivo de la activación de Rlm1 y poder comparar con lo que ocurría en presencia de cafeína. Una vez lisadas las células y obtenidos los extractos en estas tres condiciones (en presencia de cafeína, rojo Congo y a 24°C), analizamos mediante *Western blotting* los niveles de fosforilación de Slt2 y Rlm1, así como los niveles de expresión de Crh1 utilizando anticuerpos anti-fosfo-p44/p42, anti-myc y anti-GFP respectivamente.

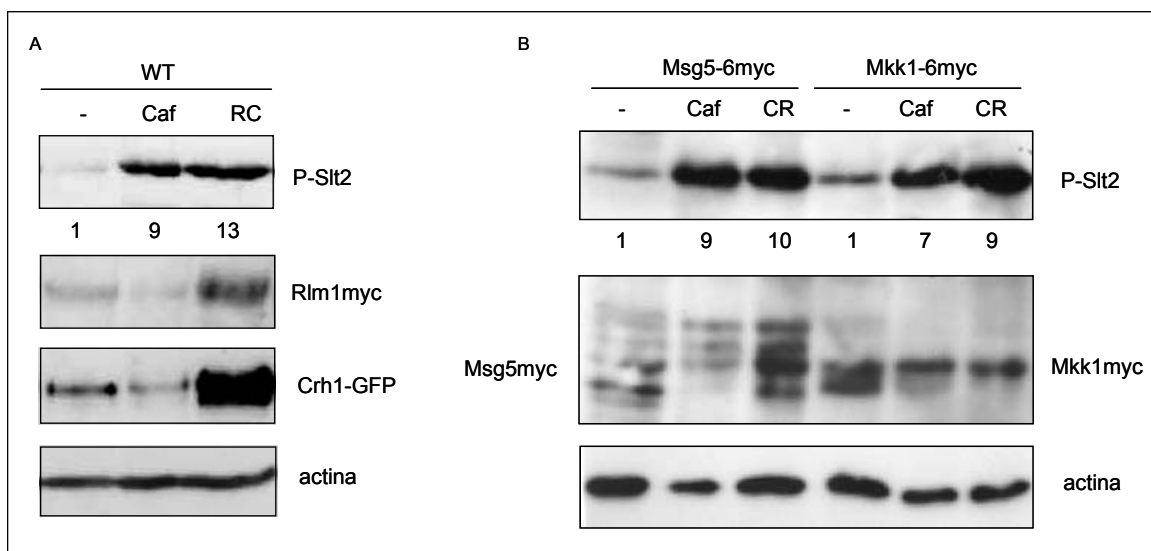


Figura 21. Efecto de la cafeína sobre la actividad de Slt2 *in vivo*. A La cepa YMM1 (silvestre) en la que Rlm1-myc está integrado en el genoma, se transformó con el plásmido pJV89GL que portaba el gen *CRH1* en fusión a *GFP*. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio selectivo durante toda la noche. Posteriormente se refrescaron en medio rico (YPD) y una vez en fase exponencial se incubaron durante 2 horas a 24°C o en presencia de rojo Congo 30 µg/ml o en presencia de cafeína 12mM. Mediante *Western blotting* se analizaron los extractos proteicos utilizando anticuerpos anti-fosfo-p44/42, anti-myc, anti-GFP y anti-actina para valorar los niveles de fosfo-Slt2, Rlm1myc, Crh1-GFP y de actina respectivamente. B. La cepa YMM1 (silvestre-Rlm1myc) se transformó con el plásmido centromérico pRS416-*MKK1myc*, y la cepa DD1-2D (*msg5Δ*) fue transformada con el plásmido YCplac22MSG5m (expresando Msg5-6myc). Tras cultivar ambas cepas en medio selectivo durante toda la noche, se refrescaron en medio rico (YPD) y una vez en fase exponencial, se incubaron durante 2 horas a 24°C o en presencia de rojo Congo 30 µg/ml o en presencia de cafeína 12mM. Mediante *Western blotting* se analizaron los extractos proteicos utilizando anticuerpos anti-fosfo-p44/42, anti-myc, y anti-actina para valorar los niveles de fosfo-Slt2, Rlm1myc y de actina, respectivamente. Los números que aparecen debajo del panel correspondiente al anti-fosfo-Slt2 indican los niveles de fosforilación de Slt2 con respecto a la actina, y relativizados al valor de 1 en condiciones basales

Como se observa en la **figura 21A**, el nivel de fosforilación de Slt2 en presencia de cafeína es similar al observado en presencia de rojo Congo; sin embargo ese nivel de fosfo-Slt2 no produce incremento significativo en la fosforilación o en la cantidad de Rlm1, ni tampoco induce la expresión de Crh1, a diferencia de lo que ocurre en células expuestas a rojo Congo.

Por tanto, en presencia de cafeína, al igual que ocurre en ausencia de Msg5, Slt2 no induce la activación del factor de transcripción Rlm1 y por consiguiente, la expresión de genes regulados por este factor de transcripción.

De manera semejante a como hicimos en el caso de mutantes *msg5Δ*, estudiamos si la reducida actividad que manifiesta Slt2 en presencia de cafeína era específica sobre Rlm1 o si también ocurría sobre otros sustratos que Slt2 fosforila en respuesta a la activación de la ruta de integridad celular. Analizamos así el efecto de Slt2 sobre Mkk1-myc (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2007), y también sobre la propia DUSP Msg5 (Flandez *et al.*, 2004).

Para poder estudiar la fosforilación *in vivo* de ambos sustratos de Slt2, se transformó la cepa silvestre YMM1 con el plásmido centromérico pRS416-*MKK1*-6myc y la cepa mutante *Δmsg5* con otro plásmido centromérico que expresa Msg5-6myc (YCplac22*MSG5m*). Ambas cepas se trataron con cafeína 12 Mm o rojo Congo 30μg/ml durante dos horas o bien en ausencia de estímulo a 24°C. Como se muestra en la **figura 21B** los niveles de fosforilación de Slt2 son similares en presencia de cafeína y de rojo Congo y la exposición a cafeína induce, al igual que el rojo Congo, un claro cambio de movilidad electroforética de Mkk1myc como consecuencia de la fosforilación ejercida por Slt2, detectado con la aparición de una única banda de menor movilidad electroforética en SDS-PAGE. También en presencia de cafeína Msg5 se fosforila ya que además de observarse en SDS-PAGE las bandas de Msg5 presentes en condiciones basales, se detectan dos bandas adicionales de mayor tamaño, correspondientes a las dos isoformas fosforiladas de esta fosfatasa, y que también aparecen en células tratadas con rojo Congo.

Por tanto, a diferencia de lo observado en mutantes *Δmsg5*, la reducida activación del factor de transcripción Rlm1 observada en presencia de cafeína es un efecto específico de la baja actividad de Slt2 sobre este factor de transcripción, ya que Slt2 es capaz de fosforilar otros sustratos como Mkk1 y Msg5 *in vivo*, tras la exposición a este compuesto.

1.7. Posibles mecanismos implicados en la falta de activación de Rlm1 en mutantes *msg5Δ*

La conclusión que se extrae de los experimentos descritos es que en ausencia de Msg5 en condiciones de crecimiento vegetativo, por algún motivo que desconocemos, la fosforilación de Slt2 no se traduce en una activación de sus sustratos, entre ellos, el factor de transcripción Rlm1 responsable de regular la mayoría de expresión de genes implicados en la reparación de daños en pared. Por tanto, pensamos que algún mecanismo a nivel molecular podría estar evitando la activación de Rlm1 en estas circunstancias.

1.7.1. Fus3 no regula negativamente la activación de Rlm1 por Slit2

Nuestra primera hipótesis situó a la MAPK Fus3 como responsable de este fenómeno. Se sabe que Fus3 en su estado activo regula negativamente a la MAPK Kss1 en condiciones de activación de la ruta de apareamiento, y al limitar la activación de esta MAPK favorece la especificidad de esta ruta (Sabbagh *et al.*, 2001). Así, la inhibición constitutiva que sufre Fus3 por Msg5 permite mantener a esta MAPK en un estado tal que favorece la señalización a través de Kss1 en condiciones de crecimiento vegetativo (Andersson *et al.*, 2004). Pensamos, por tanto, que al presentar los mutantes *msg5Δ* una activación basal de Fus3 elevada, esta MAPK podría estar regulando negativamente la activación de Rlm1 mediada por la MAPK Slit2.

Con el fin de validar esta hipótesis, en primer lugar interrumpimos el gen que codifica la MAPKK de la ruta de apareamiento Ste7 en la cepa *msg5Δ*. Para la obtención del doble mutante *msg5Δste7Δ* se procedió a la delección de *STE7* en la cepa YMM3 (BY4741*msg5ΔRLM1::6MYC*) de *S. cerevisiae* transformando el plásmido pNC149 (Company *et al.*, 1988), linearizado previamente mediante la enzima de restricción *SacI*. De esta forma, en el mutante *msg5Δste7Δ* Fus3 no estaba activo debido a la ausencia de su MAPKK, lo cual nos fue útil para estudiar la posible implicación de la MAPK en la activación de Rlm1.

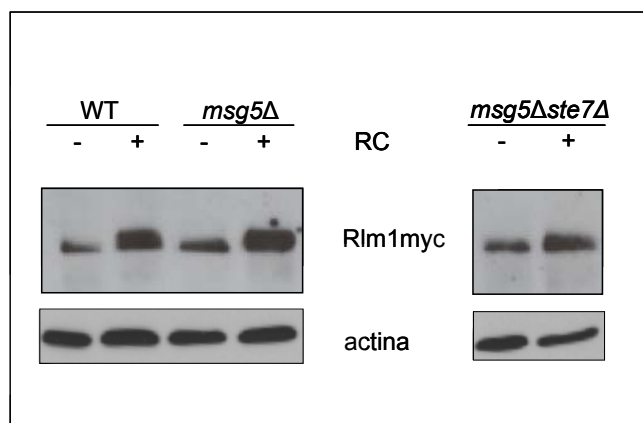


Figura 22. Efecto de la falta de activación de Fus3 sobre la actividad de Slit2 sobre Rlm1. Las cepas YMM1 (silvestre Rlm1-myc), YMM2 (*msg5Δ* Rlm1-myc) y la doble mutante *msg5Δste7Δ* Rlm1-myc se cultivaron a 24°C en medio selectivo durante toda la noche. Posteriormente se refrescaron en medio rico (YPD) y una vez en fase exponencial se incubaron durante 2 horas a 24°C y de forma paralela en presencia de rojo Congo 30 μg/ml. Mediante *Western blotting* se analizaron los extractos proteicos procedentes de los lisados celulares utilizando anticuerpos anti-myc, y anti-actina para valorar los niveles de Rlm1myc y de actina, respectivamente.

La cepa silvestre, y las mutantes *msg5Δ* y *msg5Δste7Δ*, se cultivaron en ausencia y en presencia de rojo Congo 30μg/ml durante 2 horas. Se analizaron los extractos obtenidos de éstas células mediante *Western blotting* empleando anticuerpos anti-fosfo-p44/p42 y anti-myc, que nos permiten estudiar la activación de las proteínas Slit2 y Rlm1 respectivamente. Como se indica en la **figura 22**, en el doble mutante *msg5Δste7Δ* en condiciones basales, en el cual

Fus3 no está fosforilado, no se detecta la activación de Rlm1, al igual que sucede en el mutante individual *msg5Δ* en esas mismas condiciones. Sin embargo, la estimulación con Rojo congo en el doble mutante induce la activación de este factor de transcripción. Este resultado descarta el papel de la MAPK Fus3 como regulador negativo de la activación de Rlm1 por Slt2 en ausencia de Msg5 en condiciones basales.

1.7.2. Las chaperonas Hsp90 y Cdc37 no están implicadas en la falta de activación de Rlm1 en mutantes *msg5Δ*

En condiciones de estrés, la forma doblemente fosforilada y por tanto activa de la MAPK Slt2 necesita interaccionar con la chaperona Hsp90, la cual facilita la activación del factor de transcripción Rlm1 por Slt2 (Millson *et al.*, 2005). Existe otra proteína considerada como “cochaperona” de Hsp90, Cdc37, ya que regula la actividad ATPasa de Hsp90 y físicamente interacciona con las proteínas sobre las que actúa Hsp90. En situaciones de estrés celular está demostrado que la interacción de la forma doblemente fosforilada de Slt2 con Hsp90 y Cdc37 es crucial para la respuesta dependiente de esta MAPK, como la activación del factor de transcripción Rlm1 (Hawle *et al.*, 2007).

Basándonos en este exigencia, pensamos que una falta de actividad o de cantidad de esta chaperona Hsp90, o de su cochaperona Cdc37 podrían, por tanto, ser la causa de la reducida actividad catalítica que muestra Slt2 en el mutante *msg5Δ*. Para comprobarlo, analizamos si en dicho mutante la sobreexpresión de estas proteínas por separado lograba inducir la activación del factor de transcripción Rlm1.

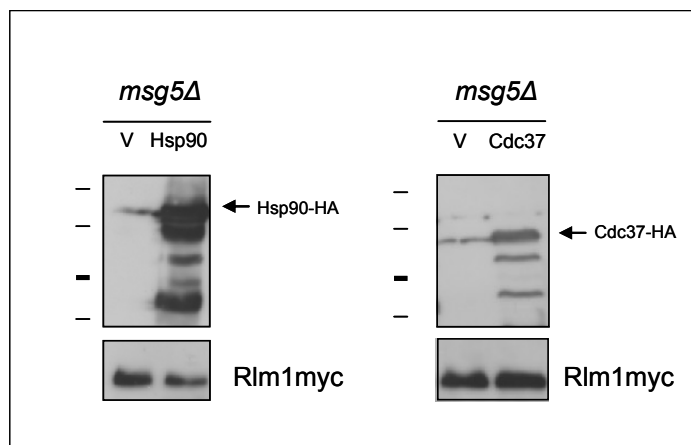


Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de Hsp90 o Cdc37 sobre la activación de Rlm1. Las cepa YMM2 (*msg5Δ* Rlm1-myc) se transformó con los plámidos PEGKG, BG1805-*HSP90* o BG1805-*CDC37*. Se cultivaron a 24°C en medio selectivo durante toda la noche, utilizando como fuente de carbono rafinosa al 1,5%. Cuando se encontraron en fase exponencial (DO~0,6) se indujo la expresión de *GST*, *HSP90* o *CDC37* mediante la adición al medio de galactosa al 2% en el cultivo. Se mantuvieron en estas condiciones durante 4 horas. Posteriormente, se sometieron de forma paralela a 2 horas más de cultivo a 24°C y a rojo Congo 30 µg/ml. Mediante *Western blotting* se analizaron los extractos proteicos procedentes de los lisados celulares utilizando anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-myc.

Para ello, en la cepa *msg5Δ* introdujimos por separado el plásmido que porta el gen que codifica la chaperona Hsp90, y el plásmido que porta el gen que codifica Cdc37 marcados con el epítipo HA, bajo el control del gen *GAL4*, de modo que se logra la sobreexpresión de cada una de ellas mediante inducción por galactosa en el medio de cultivo. Asimismo, para tener un control de las células en las mismas condiciones y sin sobreexpresión de éstas proteínas, también transformamos la misma cepa con un vector vacío de características similares, pEG(KG).

Como se puede observar en la **figura 23**, ni la sobreexpresión de Hsp90, ni de Cdc37 en ausencia de Msg5, indujo la activación del factor de transcripción Rlm1, descartando así que una reducida cantidad de estas proteínas en mutantes *msg5Δ* sea la causa de esta observación. Los plásmidos que sobreexpresan *HSP90* y *CDC37* poseen además un dominio de la proteína A, la cual es reconocida por la mayoría de los anticuerpos; por esa razón, el uso del anticuerpo anti-fosfo-p44/42 nos permitió detectar la propia proteína sobreexpresada.

2. ESTUDIO DE LA POSIBLE REGULACIÓN DE LA MAPK KSS1 POR MSG5

Como se ha explicado en la introducción, la MAPK Kss1 es responsable de la activación de la ruta de pseudofilamentación-invasividad ante situaciones de ayuno de nutrientes, aunque en otras condiciones, como en presencia de feromona, se pueden también estimular su actividad de modo transitorio. Además se ha propuesto la participación de Kss1 junto con el resto de componentes de la ruta de filamentación en la ruta SVG (*STE vegetative growth*), que se activa por alteraciones en la pared celular en mutantes incapaces de sintetizar manoproteínas (Lee & Elion, 1999).

Sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de la regulación negativa de esta MAPK por proteínas fosfatasa. Se cree que Msg5 podría regular la actividad de esta MAPK, ya que está descrito que la sobreexpresión de esta fosfatasa reduce los altos niveles de fosforilación de Kss1 inducidos por estrés hiperosmótico en un mutante *pbs2-3*, suprimiendo de esta forma la osmosensibilidad mostrada en estos mutantes (Davenport *et al.*, 1999).

Además, Kss1 al igual que Slt2 y Fus3 es una MAPK de tipo ERK, que se caracteriza por tener un residuo de glutámico situado entre la treonina y la tirosina del dominio de activación. Ya que Msg5 regula a las MAPKs Fus3 y Slt2 tanto en condiciones basales como de activación de sus correspondientes rutas, Kss1 también podría formar parte de las proteínas reguladas por esta fosfatasa.

Todo ello hizo que nos planteásemos analizar el papel de Msg5 sobre Kss1 para conocer si realmente actúa regulándola negativamente en condiciones fisiológicas en la célula.

2.1. En ausencia de Msg5 existen similares niveles de fosfo-Kss1 que los observados en la cepa silvestre a 24°C

El análisis transcriptómico de los *microarrays* de DNA en ausencia de Msg5 no mostró inducción de genes regulados transcripcionalmente por la ruta de filamentación mediada por Kss1, como *PGU1*, *YLR042*, *SVS1*, *KSS1* y *MSB2* (Cullen *et al.*, 2004; Madhani *et al.*, 1999). Únicamente *TSL1*, un gen activado transcripcionalmente en condiciones de crecimiento pseudofilamentoso por el factor de transcripción Tec1 (Madhani *et al.*, 1999), mostró una ligera inducción en mutantes *msg5Δ*. Además, de los 11 genes para los que no se había descrito que se activaban transcripcionalmente tras la activación la ruta de apareamiento ni de integridad celular, sólo 3 de ellos, *ARG1*, *STP4* y *YGR250C*, se habían asociado con el factor de transcripción Tec1 que opera en la ruta de filamentación mediante análisis de *ChIP-on-chip* (YEASTRACT). Por tanto, los resultados extraídos de este análisis transcripcional en ausencia de Msg5 no sugerían ninguna función relevante de la proteína fosfatasa Msg5 en la respuesta transcripcional regulada por la MAPK Kss1.

La forma más directa de medir activación de Kss1 es mediante el análisis de los niveles de fosforilación de esta MAPK. Por ello, como mostramos en la **figura 14**, se analizaron los niveles de fosforilación de la MAPK Kss1 en la cepa silvestre BY4741 y la cepa mutante *msg5Δ* isogénica en condiciones basales. Se obtuvieron las muestras de las células creciendo a 24°C, situación en la que ésta ruta no se encuentra activada. Mediante *Western blotting* se estudiaron los niveles de fosforilación de la MAPK Kss1 en ambas cepas. Al comparar los niveles de fosforilación de Kss1 a 24°C en la cepa silvestre con los observados en la cepa carente de Msg5, no se observaron variaciones significativas (**figura 15**).

Este resultado confirma que Msg5 no actúa en condiciones de ausencia de estimulación regulando negativamente la MAPK de la ruta de invasividad-pseudofilamentación Kss1.

2.2. Msg5 no regula el nivel de fosforilación de Kss1 en condiciones de activación de esta MAPK

Con el fin de profundizar en el estudio del efecto de Msg5 en la ruta de filamentación estudiamos el posible papel de esta fosfatasa sobre Kss1 en condiciones de activación de esta MAPK.

Está descrito que la presencia de feromona (Sabbagh *et al.*, 2001) o de 1-butanol (Andersson *et al.*, 2004) induce la activación de la MAPK Kss1. Por tanto, comparamos los niveles de fosfo-Kss1 en una cepa silvestre BY4741 y su isogénica *msg5Δ* sometidas ambas a la presencia de cada uno de estos agentes por separado; α -factor 50μM durante 15 minutos, o 1-butanol al 1% durante 1 hora. Una vez recogidas las células, fueron lisadas y los extractos se analizaron mediante *Western blotting* empleando los anticuerpos anti-fosfo-p44/p42 para analizar los niveles de fosforilación de la MAPK Kss1.

Como se puede observar en la **figura 24**, la presencia de cada uno de estos agentes induce la activación de Kss1 en la cepa silvestre; sin embargo, los niveles de fosforilación de Kss1 mostrados por el mutante *Δmsg5* en presencia de feromona (**figura 24A**) o de 1-butanol (**figura 24B**) no son mayores a los observados en la cepa silvestre, incluso se observa un ligero descenso de los niveles de fosfo-Kss1. Este ensayo indica ausencia de regulación negativa por parte de Mgs5 sobre Kss1 en estas condiciones de estimulación.

Quisimos ampliar el estudio analizando esta posible regulación en otras condiciones que también indujesen la activación de Kss1. Con este fin, buscamos otros estímulos capaces de activar a la MAPK Kss1. Como ya se ha comentado, Kss1 participa en la ruta de crecimiento vegetativo (SVG), la cual interviene en procesos de remodelación de la pared celular en mutantes afectados en la síntesis de manoproteínas (Lee & Elion, 1999). Además, esta MAPK se fosforila en mutantes afectados en la construcción de la pared celular como *mnn9Δ*, *kre6Δ*, *gas1Δ* o *fks1Δ* (comunicación personal de José María Rodríguez-Pachón), lo cual indica que Kss1 se activa en distintas situaciones que afectan a la integridad de la pared celular. Pensamos por tanto que agentes que alterasen la pared celular, podrían activar la MAPK Kss1. Así que

estudiamos el efecto que producía sobre Kss1 la presencia de rojo Congo, compuesto que, como se ha comentado, altera fundamentalmente el ensamblaje de las cadenas de quitina (Roncero & Duran, 1985) y de zimoliasa, una mezcla de enzimas con actividad β -glucanasa que digieren la pared celular de las levaduras.

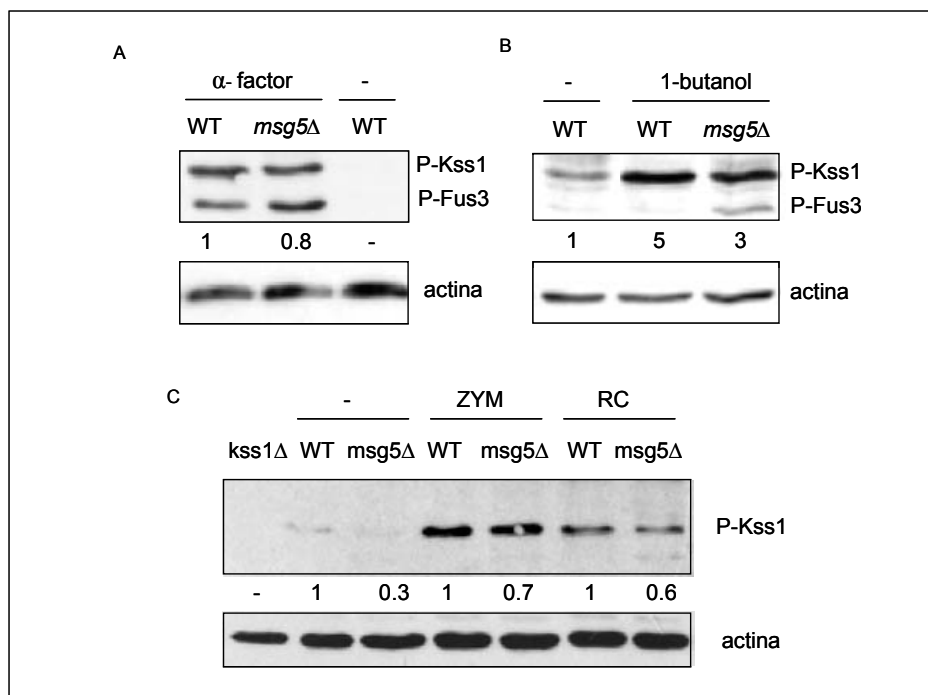


Figura 24. Efecto de la ausencia de *Msg5* sobre los niveles de fosforilación de Kss1 en condiciones de activación de esta MAPK. Análisis mediante *Western blotting* de los extractos proteicos de las cepas isogénicas BY4741 (silvestre), Y07373 (*msg5* Δ), creciendo en medio rico (YPD) a 24°C o tras tratamiento con feromona 50 μ M durante 15 minutos (**A**), o con butanol al 1% durante 60 minutos (**B**), o con zimoliasa 0,8U/ml durante 3 horas y con rojo Congo 30 μ g/ml durante 2 horas (**C**). La membrana se incubó con anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-actina para estudiar los niveles de fosforilación de fosfo-Kss1 y de actina respectivamente. Los números que aparecen debajo del panel correspondiente al anti-fosfo-MAPK indican los niveles de fosforilación de Kss1 con respecto a la actina, y relativizados al valor de 1 considerado para la cepa silvestre.

Para ello sometimos a las células silvestres (BY4741) y mutantes *msg5* Δ en paralelo a tratamiento con rojo Congo (30 μ g/ml) durante dos horas o con zimoliasa 0,8U/ml durante 3 horas. Los extractos obtenidos del lisado celular se analizaron mediante *Western blotting*. Como se observa en la **figura 24C**, los estímulos ensayados en las células silvestres producían un incremento en los niveles de fosfo-Kss1 respecto a las condiciones basales, lo cual indica que estímulos que activan la ruta de integridad celular como son la presencia de rojo Congo (30 μ g/ml, 2h), o de zimoliasa (0,8 U/ml, 3h), también son capaces de inducir la fosforilación y por tanto activar a la MAPK Kss1. Sin embargo, en presencia de rojo Congo o zimoliasa, la cepa carente de *Msg5* no presenta mayor nivel de fosforilación de Kss1 que la cepa silvestre, sino

incluso algo inferior, lo cual indica que Msg5 tampoco modula negativamente la fosforilación de Kss1 en otras condiciones de activación de esta MAPK.

Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la sobreexpresión de Msg5 reduce los niveles de fosforilación de Kss1 inducidos en respuesta a estrés osmótico en un mutante *pbs2-3*, en los cuales la MEK de la ruta de osmolaridad se encuentra afectada (Davenport *et al.*, 1999). Basándonos en este resultado, nos preguntamos si la sobreexpresión de Msg5 también reduciría la fosforilación de Kss1 inducida por zimoliasa o en mutantes *itc1Δ*, que al carecer del factor remodelador de cromatina Itc1 presentan incrementada la señalización a través de ruta de apareamiento debido a una estimulación autocrina (Ruiz *et al.*, 2003).

Para este fin, transformamos la cepa silvestre BY4741 así como su isogénica *itc1Δ* con los plásmidos pEG(KG) y pEG(KG)-MSG5 para inducir la sobreexpresión de Gst y de Gst-Msg5 respectivamente. Los transformantes crecieron en medio selectivo utilizando rafinosa como fuente de carbono durante toda la noche. La adición de galactosa al medio de cultivo durante 6 horas indujo la sobreexpresión de la proteína de fusión Gst-Msg5 en la cepa *itc1Δ* y con este mismo fin, en el caso de la cepa silvestre, se cultivó durante 3 horas en el medio con galactosa y posteriormente se añadió zimoliasa 0,8 U/ml durante 3 horas más para activar Kss1. Se recogieron y lisaron las células y mediante *Western blotting*, empleando anticuerpos anti-fosfo-p44/42, se comparó la fosforilación de Kss1 en ausencia y presencia de sobreexpresión de Msg5 en ambas cepas.

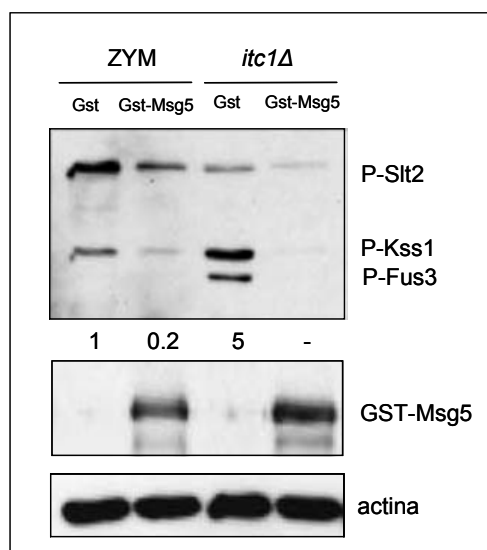


Figura 25. Efecto de la sobreexpresión de Msg5 sobre la fosforilación de Kss1. La cepa BY4741 (silvestre) así como la cepa isogénica *itc1Δ*, se transformaron con el vector pEG(KG) expresando Gst y con el plásmido pEG(KG)MSG5 expresando Gst-Msg5. Las células se cultivaron en medio selectivo con rafinosa al 1,5% como fuente de carbono y se indujo la expresión proteica mediante la adición de galactosa a una concentración final del 2% durante 6 horas, estando en la cepa silvestre 3 de estas 6 horas en presencia también de zimoliasa 0,8 U/ml. Se obtuvieron los extractos y se analizaron mediante *Western blotting* con anticuerpos anti-fosfo-p44/42, anti-GST y anti-actina para estudiar los niveles de fosfo-MAPKs, Gst-Msg5 y actina, respectivamente. Los números que aparecen debajo del panel correspondiente al anti-fosfo-MAPK indican los niveles de fosforilación de Kss1 con respecto a la actina, y relativizados al valor de 1 en condiciones correspondientes a la cepa silvestre expresando Gst y en presencia de zimoliasa.

Como podemos observar en la **figura 25**, la sobreexpresión de Msg5 además de reducir, como era esperable, la fosforilación de Slt2, redujo la cantidad de fosfo-Kss1 en células silvestres tratadas con zimoliasa. En el mutante *itc1 α 1*, además de reducir el nivel de fosfo-Slt2 y fosfo-Fus3, también produjo una elevada reducción de la fosforilación de Kss1. Estos resultados demuestran que en condiciones de sobreexpresión, Msg5 es capaz de desfosforilar esta MAPK, al igual que lo hace con Slt2 y Fus3.

Sin embargo, a pesar de que Msg5 muestra capacidad de actuar como una fosfatasa sobre Kss1, nuestros datos reflejan que la ausencia de la Msg5, a diferencia de lo que ocurre sobre Slt2 y Fus3, no provoca un incremento de fosforilación de Kss1 y por tanto descarta un papel relevante de Msg5 como regulador negativo sobre Kss1 en condiciones fisiológicas tanto en condiciones basales como en las situaciones de activación de Kss1 ensayadas.

3. ESTUDIO DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DE Msg5

Msg5 se produce en la célula como dos isoformas de distinto tamaño molecular como consecuencia de un comienzo alternativo de la traducción del RNAm; la isoforma larga de Msg5 (Msg5^L) posee 45 aminoácidos adicionales en su región amino-terminal que no posee la versión corta de la proteína (Msg5^S). Ambas formas interaccionan con Slt2 mostrando similar afinidad y tienen el mismo efecto negativo sobre los niveles de fosforilación de Slt2 (Flandez *et al.*, 2004).

Sin embargo, la existencia de una isoforma de Msg5 carente de los 45 primeros aminoácidos (Msg5^S) permite especular con la posibilidad de que ésta pueda desempeñar alguna función distinta de la proteína completa (Msg5^L). La afinidad de cada una de las isoformas por las MAPKs Fus3 y Kss1 aún no ha sido estudiada, ni tampoco si la función ejercida por cada una de las isoformas sobre estas MAPKs es similar. Con este fin, se profundizó en el análisis diferencial de la interacción de ambas isoformas con estas MAPKs.

3.1. Msg5^L presenta mayor afinidad que Msg5^S por las MAPKs Fus3 y Kss1

Se realizaron ensayos de interacción mediante experimentos de copurificación de Msg5 con cada una de las MAPKs Slt2, Fus3 y Kss1 en células creciendo a 24°C. Para ello, transformamos la cepa YMF1 en la que Msg5 estaba marcada con el epítipo myc con los plásmidos pEG(KG), pEG(KG)-*SLT2*, pEG(KG)-*FUS3* o pEG(KG)-*KSS1* que expresan respectivamente las proteínas de fusión Gst, Gst-Slt2, Gst-Fus3 o Gst-Kss1. Tras cultivar las células a 24°C y obtener los extractos celulares, se purificó Gst ó los complejos de unión a las proteínas de fusión en cada caso empleando una matriz con Glutathione y se detectó mediante *Western blotting* con anticuerpos anti-myc la presencia de Msg5myc como resultado de la interacción con las MAPKs.

Como se observa en la **figura 26A**, en todos los extractos proteicos antes de llevar a cabo la purificación se detecta aproximadamente la misma cantidad de ambas isoformas de Msg5myc, así como de Gst y de cada una de las tres MAPKs fusionadas a Gst. Tras la purificación, las tres MAPKs fusionadas a Gst fueron capaces de retener Msg5myc, a diferencia de lo ocurrido en las muestras procedentes de la purificación de Gst. El hecho de que no se detecte ninguna señal a la altura esperada para Msg5myc cuando se purifica sólo Gst demuestra que las MAPKs retienen a Msg5 debido a la interacción específica entre ambas proteínas.

Como ya estaba descrito, observamos cómo tras la purificación de Gst-Slt2 se detecta la presencia de las dos isoformas de Msg5myc en similar proporción, consecuencia de la interacción de Msg5myc y Gst-Slt2 (Flandez *et al.*, 2004). Sin embargo tras la purificación de

Gst-Fus3 y Gst-Kss1, la forma larga de Msg5 (Msg5^Lmyc) es retenida más eficazmente que la forma corta de Msg5 (Msg5^Smyc) por las MAPKs Fus3 y Kss1 (**figura 26A**).

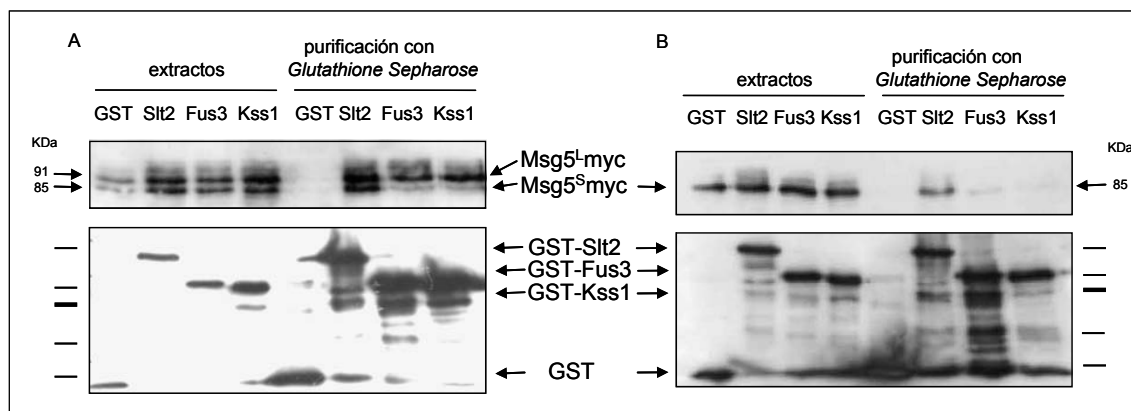


Figura 26. Copurificación de Msg5^Lmyc y Msg5^Smyc con las proteínas de fusión Gst, Gst-Slt2, Gst-Fus3 y Gst-Kss1. Análisis mediante *Western blotting* de los extractos de la cepa YMF1 (1783 Msg5myc) (**A**) y de la cepa DD1-2D (*msg5Δ*) transformada con el plásmido YCplac22MSG5-M1A (expresando la isoforma Msg5^Smyc) (**B**). Estas cepas se transformaron con los plásmidos pEG(KG) (expresando Gst), pEG(KG)-SLT2 (expresando Gst-Slt2), pEG(KG)-FUS3 (expresando Gst-Fus3), o pEG(KG)-KSS1 (expresando Gst-Kss1) como se indica en la figura. Las células se cultivaron en medio líquido selectivo a 24°C, utilizando como fuente de carbono rafinosa al 1,5%. Cuando se encontraron en fase exponencial (DO~0,6) se indujo la expresión de Gst, Gst-Slt2, Gst-Fus3 o Gst-Kss1 mediante la adición al medio de galactosa al 2%. Se mantuvieron en estas condiciones durante 4 horas y posteriormente a 24°C durante 2 horas más. Se purificó Gst y las proteínas unidas a Gst con *Glutathione Sepharose*. Tanto los extractos celulares como los complejos purificados fueron analizados mediante *Western blotting* con anticuerpos anti-myc (en los paneles superiores) y anti-Gst (en los paneles inferiores), para analizar la presencia de Msg5 y de las MAPKs respectivamente. Los cuatro primeros carriles corresponden a los extractos proteicos sin purificar, como control de la expresión de Msg5^Lmyc y Msg5^Smyc sin purificar y de la expresión de cada una de las MAPKs fusionadas a Gst. En los cuatro últimos carriles se muestra el resultado tras la purificación (proteínas retenidas).

Con el fin de conocer si la menor interacción de la forma corta de Msg5 con las MAPKs Fus3 y Kss1 dependía de la presencia de la forma larga de Msg5 en la célula, se repitieron los experimentos de copurificación en células que expresaban sólo la forma corta de la proteína Msg5^Smyc. Para ello, expresamos en la cepa mutante *msg5Δ* (DD1-2D) al mismo tiempo una versión mutante de Msg5 en la metionina 45 marcada con myc (que expresa Msg5^Smyc) y las proteínas de fusión Gst, Gst-Slt2, Gst-Fus3 o Gst-Kss1. En la **figura 26B** observamos que, al igual que en el experimento realizado previamente, antes de llevar a cabo la purificación se detecta Msg5^Smyc en similar cantidad en cada uno de los extractos, así como la presencia de Gst y de cada una de las MAPKs fusionadas a Gst. Tras la purificación procedente de las células incubadas a 24°C, se observa de nuevo que la forma corta de Msg5 no es retenida de manera significativa por Gst-Fus3 y Gst-Kss1, mientras que Gst-Slt2 sí arrastra Msg5^Smyc en el proceso de purificación. Tampoco aquí se observa Msg5^Smyc retenido en las muestras procedentes de la purificación de Gst.

Los resultados de ambos experimentos indican que las dos isoformas de Msg5 interaccionan con distinta afinidad con las diferentes MAPKs. Así, la forma corta de Msg5 presenta menor afinidad de unión a Fus3 y Kss1 independientemente de la presencia de la otra isoforma de Msg5.

3.2. Análisis de la actividad de las isoformas de Msg5 sobre la MAPK Fus3 en respuesta a feromona

El hecho de que la forma corta de Msg5 mostrase menor afinidad de unión a Fus3 y Kss1 nos llevó a plantearnos la posibilidad de que la distinta afinidad implicase una actividad diferente frente a estas MAPKs. Para estudiar esta hipótesis se llevaron a cabo una serie de experimentos encaminados a estudiar la actividad de cada una de estas isoformas hacia ambas MAPKs, en respuesta al tratamiento con feromona.

3.2.1. Msg5^L es más efectiva que Msg5^S en la defosforilación de Fus3 en presencia de feromona

La estimulación por feromona induce en la célula la activación de la MAPK de la ruta de apareamiento Fus3, así como también una activación transitoria la MAPK Kss1. Ambas MAPKs son necesarias para la inducción de los genes de apareamiento (Sabbagh *et al.*, 2001). Sin embargo, es Fus3 la principal responsable de la señalización en estas situaciones (Ma *et al.*, 1995). Escogimos esta situación de estimulación por feromona para estudiar el efecto de cada una de las isoformas de esta fosfatasa *in vivo* sobre los niveles de fosforilación inducidos de estas dos MAPKs en estas condiciones.

Para ello, en primer lugar transformamos una cepa *msg5Δ* (DD1–2D) con los plásmidos que expresan cada una de las isoformas de Msg5myc por separado (Ycplac22*MSG5-M45A* y Ycplac22*MSG5-M1A* que expresan Msg5^Lmyc y Msg5^Smyc respectivamente) así como con el vector centromérico vacío Ycplac22. Los distintos transformantes se cultivaron tanto en ausencia como en presencia de factor α (50μM) durante 10 y 30 minutos. Posteriormente se analizaron mediante *Western blotting* los niveles de fosforilación de Fus3 y Kss1 presentes en los extractos de las muestras recogidas, usando anticuerpos comerciales anti-fosfo-p44/42 para estudiar la fosforilación de éstas MAPKs, así como anticuerpos anti-myc para detectar la presencia de cada una de las isoformas de Msg5.

En la **figura 27** se observa como, tras la exposición a la feromona, las células que expresan la forma corta de Msg5 (Msg5^Smyc) muestran mayores niveles de fosforilación de Fus3 que aquellas que expresan la forma larga (Msg5^Lmyc), tanto a los 10 como a los 30 minutos de tratamiento. Sin embargo no se aprecian estas diferencias en los niveles de fosfo-Kss1 entre las células transformadas con los plásmidos que portan cada una de las isoformas de Msg5.

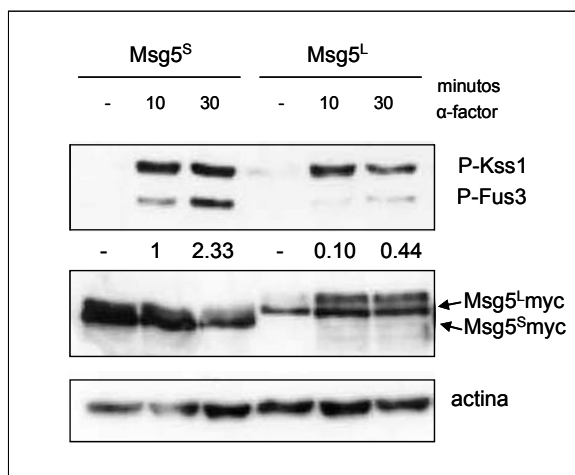


Figura 27. Efecto de la presencia de cada una de las isoformas de Msg5 sobre la fosforilación de las MAPKs Fus3 y Kss1. La cepa DD1-2D (*msg5Δ*) se transformó con los plásmidos YCplac22MSG5-M1A o YCplac22MSG5-M45A, que expresan las proteínas Msg5^Smyc y Msg5^Lmyc respectivamente. Estos transformantes se cultivaron en medio selectivo a 24°C y fueron tratados con factor α (50μM) durante 10 y 30 minutos. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western blotting* con anticuerpos anti-fosfo-p44/42, anti-myc y anti-actina. Los números que aparecen debajo del panel correspondiente al anti-fosfo-MAPK indican los niveles de fosforilación de Fus3 con respecto a la actina, y relativizados al valor de 1 asignado al nivel correspondiente al carril número 2.

Este primer estudio sobre la actividad de ambas isoformas *in vivo* sugería que la forma larga Msg5^L muestra mayor actividad fosfatasa sobre Fus3 que la forma corta, mientras no se apreciaban diferencias significativas sobre la MAPK Kss1. Es por ello que los siguientes estudios se centraron en estudiar la actividad de ambas isoformas sobre la MAPK Fus3, ya que es sobre la que observamos indicios de existir diferente funcionalidad.

Como se puede observar en el panel central de la **figura 27**, tras la estimulación con feromona, se produce un aumento de la fosforilación de la proteína Msg5^L-myc. Se sabe que la presencia de feromona induce la activación no sólo de la ruta de apareamiento, sino también de la ruta de integridad celular. Ya que la MAPK Slt2 es capaz de fosforilar a Msg5 en condiciones que activan la ruta de integridad celular (Flandez *et al.*, 2004), pensamos que este aumento de movilidad electroforética de Msg5 en presencia de feromona podría ser consecuencia de la fosforilación ejercida por Slt2. Para comprobar si esta hipótesis era cierta, estudiamos el efecto de la ausencia de actividad de cada una de las MAPKs sobre los niveles de fosforilación de la forma larga de Msg5 en presencia de feromona; averiguaríamos así cual de ellas es la causante de esa fosforilación. Utilizamos para este fin una cepa que porta un alelo de Kss1 no funcional (SEY6211), así como los mutantes isogénicos *ste7Δ* y *slt2Δ*. Transformamos cada una de estas cepas con el plásmido YcPlac22MSG5-M45A, que expresa Msg5^L-myc; los transformantes se cultivaron a 24°C y se estimularon con factor α (50μM) durante 10 minutos. Mediante *Western blotting* (**figura 28**) utilizando anticuerpos anti-myc se analizaron los niveles de fosforilación de Msg5^L-myc, y con anticuerpos anti-fosfo-p44/42 se observó la activación de las distintas MAPKs.

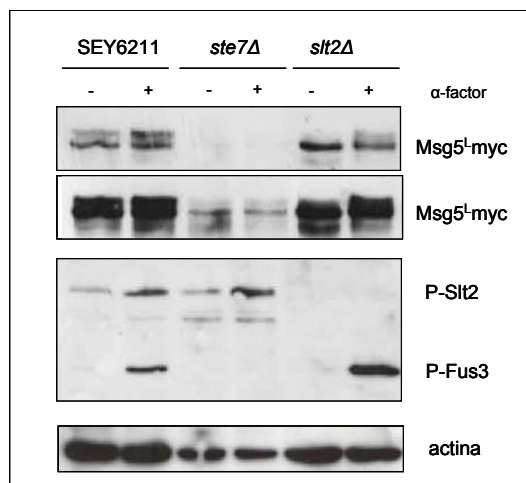


Figura 28. Influencia de las distintas MAPKs en la fosforilación de Msg5^{L} tras estimulación con feromona. Análisis mediante *Western blotting* de los extractos proteicos de las cepas SEY6211 (Kss1 no funcional), YTX50 (*ste7Δ*) y HM52 (*slt2Δ*) transformadas con el plásmido YCplac22MSG5-M45A que expresa $\text{Msg5}^{\text{L}}\text{-myc}$ cultivadas en medio selectivo a 24°C y tratadas con feromona 50μM durante 10 minutos. La membrana se incubó con anticuerpos anti-myc, anti-fosfo-p44/42, y anti-actina. El panel intermedio de la figura corresponde a una mayor exposición de la película durante el revelado para observar mejor la señal en el mutante *ste7Δ*.

Se observó así que, en ausencia de Kss1 (SEY6211) y tras estimulación con feromona, se produce un aumento de la forma fosforilada de Msg5^{L} detectado por un cambio de movilidad electroforética de $\text{Msg5}^{\text{L}}\text{-myc}$ en SDS-PAGE; sin embargo esta fosforilación no se produce en el mutante *ste7Δ* que carece de la MAPKK responsable de la activación de las MAPKs Fus3 y Kss1. Esto sugiere que Fus3 (y no Kss1) participa en esta fosforilación de la forma larga de Msg5 tras estimulación con feromona. Además, en la cepa carente de Slt2 y de Kss1 funcional (SEY6211 *slt2Δ*) también se produce este cambio electroforético de $\text{Msg5}^{\text{L}}\text{-myc}$ en presencia de factor α , lo cual sugiere que la única MAPK que en este último caso se encuentra activa, Fus3, está implicada en la fosforilación de Msg5^{L} tras estimulación con feromona. Sin embargo, no se puede descartar un posible papel de Slt2 en dicha fosforilación, ya que tanto en condiciones basales como de activación se observa menor cantidad de Msg5 fosforilada en el mutante *slt2Δ*. Como se observa en la **figura 28**, la cantidad de $\text{Msg5}^{\text{L}}\text{-myc}$ fue menor en el mutante *ste7Δ* que en las ptra cepas ensayadas.

3.2.2. La transcripción de los genes *FIG1* y *ASG7* es mayor en presencia de Msg5^{S} que de Msg5^{L}

Continuando con el estudio de la actividad de las isoformas de Msg5 sobre Fus3, y con el fin de obtener más datos que corroboraran la mayor actividad de Fus3 en presencia de Msg5^{S} , se realizaron estudios de expresión génica mediante experimentos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Estos experimentos nos permitieron cuantificar la expresión de genes regulados por la activación de la MAPK Fus3 en células que expresaran únicamente cada una de estas isoformas. Se eligió estudiar la expresión de *FIG1* y *ASG7*, dos genes cuya inducción transcripcional está controlada por la ruta de apareamiento mediada por la MAPK

Fus3 (Roberts *et al.*, 2000), y que han mostrado altos valores de inducción en ausencia de Msg5 en el estudio de los *microarrays* en mutantes *msg5Δ*. Por tanto, se trata de unos buenos indicadores de la actividad de la MAPK Fus3. Los mRNAs para este estudio procedían de células que expresaban cada una de las isoformas de Msg5 tras tratamiento con feromona 15μM durante 10 minutos.

En la **figura 29** aparecen los resultados de la inducción de estos dos genes expresados como ratio (mRNA Msg5^S/Msg5^L) de los niveles de mRNA obtenidos en células que expresan la forma corta de Msg5 (Msg5^Smyc) frente a los niveles de mRNA obtenidos en células que expresan la forma larga (Msg5^Lmyc). En todos los casos, tanto en ausencia como en presencia de feromona, el ratio mRNA Msg5^S/Msg5^L para *FIG1* y *ASG7* es mayor que la unidad, lo cual indica mayor inducción transcripcional de ambos genes en presencia Msg5^S debido a una mayor actividad de la MAPK Fus3. Estos datos coinciden con los mayores niveles de fosfo-Fus3 observados en presencia de Msg5^S frente a los obtenidos con Msg5^L en condiciones de estimulación con feromona (**figura 27**). Por tanto la mayor actividad de Fus3 en presencia de Msg5^S denota una menor actividad fosfatasa de esta isoforma respecto a la forma larga sobre dicha MAPK.

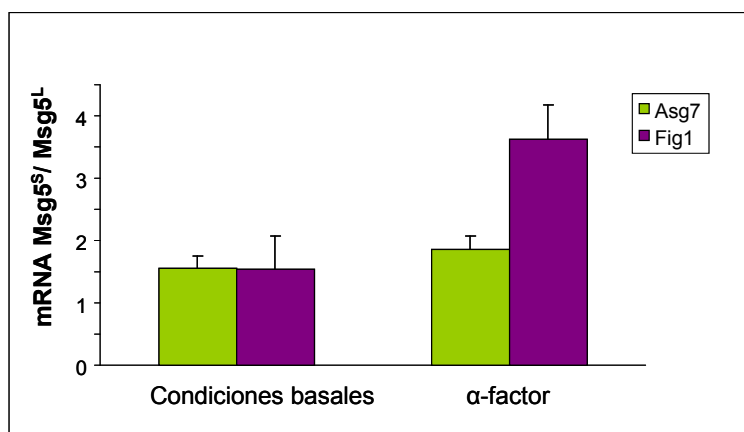


Figura 29. Análisis comparativo de expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa de dos genes dependientes de Fus3. La cepa DD1-2D (*msg5Δ*) se transformó con los plásmidos YCplac22MSG5-M1A o YCplac22MSG5-M45A, que expresan las proteínas Msg5^Smyc y Msg5^Lmyc respectivamente. Los valores corresponden a la media de los *ratios* del mRNA de los genes *ASG7* y *FIG1* de células *msg5Δ* transformadas con Ycplac22MSG5-M1A (que expresan Msg5^S) respecto a los obtenidos en células transformadas con Ycplac22MSG5-M45A (que expresan Msg5^L), en condiciones basales y tras 10 minutos de tratamiento con feromonas (15μM α-factor). Estos experimentos se repitieron 3 veces en presencia de feromona, y 4 veces en condiciones basales, y con el conjunto de resultados obtenidos se obtuvo en cada caso el valor medio que en la figura aparece representado. Las barras de error representan el error estándar.

3.2.3. Tras estimulación con feromona, *Msg5^S* induce la formación de *shmoos* de mayor tamaño y en mayor porcentaje que *Msg5^L*

Como se comentó en la introducción, la unión de feromonas al receptor celular desencadena una serie de respuestas a nivel celular que incluyen una respuesta transcripcional específica, parada del ciclo celular en la fase G1 y una polarización del crecimiento. Todos estos cambios permiten a la célula formar unas prolongaciones de apareamiento hacia la fuente de feromona, adquiriendo una morfología denominada *shmoo*, que permite que las dos células haploides de tipo sexual opuesto se fusionen para dar lugar a un cigoto diploide. La formación de *shmoos* constituye por tanto otro parámetro a estudiar que refleja la actividad de la ruta de apareamiento mediada por la MAPK Fus3.

Para este estudio, mediante observación al microscopio óptico, realizamos un recuento del número de *shmoos* formados en respuesta a feromona por células que expresaban cada una de las isoformas de *Msg5* por separado.

Para ello, en primer lugar se transformó la cepa mutante *msg5Δ* (DD1–2D) con plásmidos centroméricos Ycplac22*MSG5-M1A* o Ycplac22*MSG5-M45A*, que expresan, *Msg5^S* o *Msg5^L* respectivamente. Se cultivaron ambos tipos de transformantes en medio selectivo y se estimularon con feromona 50μM. Se contabilizó microscópicamente cuántas de las células analizadas de cada tipo de transformante formaban estas prolongaciones tras 1, 2 y 4 horas en presencia de este estímulo.

Los datos reflejados en la **figura 30A** permiten afirmar que, a todos los tiempos analizados, es mayor el porcentaje de *shmoos* formados por células que expresan *Msg5^S* que por aquellas células que solamente expresan *Msg5^L*. Esto indica que existe mayor actividad de la ruta regulada por Fus3 en presencia de la *Msg5^S*, y por tanto, que esta isoforma es menos activa como fosfatasa sobre Fus3 que la forma larga.

El análisis microscópico también reveló información sobre la morfología de los *shmoos*. Medimos la longitud de células de los dos tipos de transformantes tras 4 horas de tratamiento con feromona 50μM usando el programa *Aquacosmos Imagen System* y fotografiando alguno de estos *shmoos* en las condiciones mencionadas (**figura 30C**).

En función de las medidas de los *shmoos*, se establecieron tres posibles rangos de tamaño, tal y como se indica en la **figura 30B**. Se observa que hay mayor porcentaje de *shmoos* de menor tamaño en las células que expresan *Msg5^L* (<15μm); sin embargo cuando las células expresan *Msg5^S* es más elevado el porcentaje de *shmoos* de mayor longitud (15-20μm).

Por tanto el análisis morfológico refleja que las células que expresan *Msg5^S* presentan proyecciones más pronunciadas que las que se forman en presencia de *Msg5^L*.

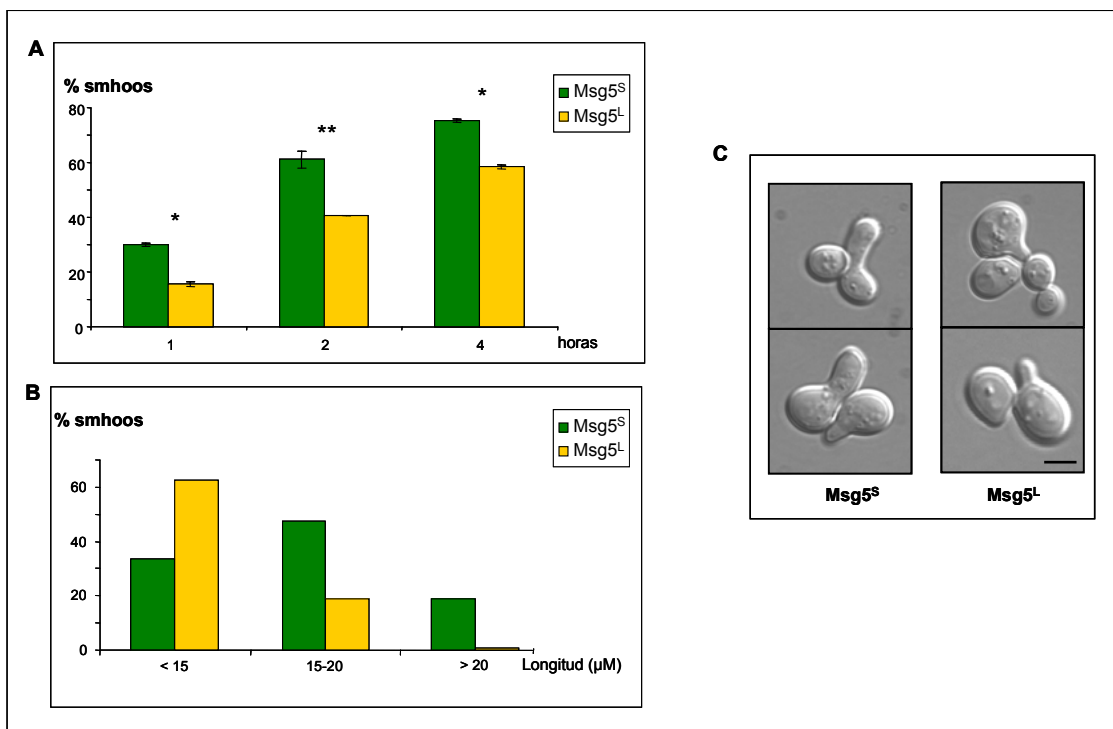


Figura 30. Análisis comparativo del porcentaje y morfología de *shmoo*s en presencia de Msg5^S y Msg5^L. La cepa DD1-2D (*msg5Δ*) se transformó con los plásmidos YCplac22MSG5-M1A o YCplac22MSG5-M45A, que expresan las proteínas Msg5^Smyc y Msg5^Lmyc respectivamente y se cultivaron en medio selectivo en presencia de feromona (50μM α -factor) durante un máximo de 4 horas. **(A)** Se contaron el número de *shmoo*s formados de un total de 150 células de los dos tipos de transformantes a los tiempos indicados (1, 2 y 4 horas) tras la adición de α -factor, usando el programa *Aquacosmos Imagen System*. Este experimento se realizó por duplicado. Se representa en porcentaje de *shmoo*s formados por cada tipo de transformante a cada tiempo indicado. Las barras de error corresponden al error estándar. Un asterisco indica $P < 0.1$ y un doble asterisco indica $P < 0.01$ calculado mediante el test de T de Student **(B)** Se midió la longitud de al menos 100 células de cada tipo de tipos de transformantes tras 4 horas de tratamiento con feromona, usando el programa *Aquacosmos Imagen System*. Para su representación, las células se distribuyeron en tres rangos de longitud distintos en función de la medida del *shmoo* tal y como se indica en la gráfica. **(C)** Observación microscópica de la morfología de estas células tras 4 horas de tratamiento con feromona 50nM fotografiada utilizando la técnica DIC (*Differential Interference Contrast*). Barra de la escala 5 μm.

Todos los resultados obtenidos de estudios sobre la actividad de las cada una de las formas de Msg5 sobre la MAPK Fus3 a nivel de fosforilación, de actividad transcripcional dependiente de dicha MAPK y de formación de *shmoo*s como consecuencia de la respuesta a feromona, permiten afirmar que Msg5^L es más activa que Msg5^S regulando negativamente a la MAPK de apareamiento Fus3 en condiciones de estimulación de esta ruta.

4. ANÁLISIS DE LAS REGIONES IMPLICADAS EN LA INTERACCIÓN DE Msg5 CON LAS DIFERENTES MAPKS

Hemos visto que, al igual que ocurre con otras DUSPs en células eucarióticas superiores, Msg5 es capaz de modular la acción de diversas MAPKs. Cómo una misma fosfatasa puede actuar de manera selectiva en un determinado momento frente a una MAPK y no frente a otras, es una cuestión a la que hemos tratado de buscar respuesta. Nuestros estudios se han encaminado a profundizar en los procesos de modulación negativa de MAPKs y especialmente a los mecanismos que regulan la especificidad de acción de las proteínas fosfatasas y las posibilidades de regulación de su función por MAPKs. Con este fin, uno de nuestros objetivos era el análisis de las regiones implicadas en la interacción de Msg5 con las distintas MAPKs a las que regula, poniendo especial atención a los factores que afectan a la especificidad que muestra esta fosfatasa.

Decidimos estudiar la interacción de Msg5 con las MAPKs Slt2, Fus3 y Kss1 utilizando el sistema de dos híbridos basado en el factor de transcripción Gal4. En este sistema es necesaria la presencia de los dos dominios de que se compone este factor de transcripción para que se produzca la expresión de determinados genes reporteros. Las proteínas en estudio se fusionan al dominio de unión a DNA BD (por *binding domain*) y al dominio de activación de la transcripción AD (por *activation domain*) de Gal4 presentes en dos plásmidos diferentes. El fin último es que ambos plásmidos se encuentren en la misma célula para que, en el caso de que ambas proteínas interaccionen entre sí, los dominios del factor de transcripción se unan y se induzca la expresión de distintos genes reporteros correspondientes.

Inicialmente este ensayo se realizó fusionando las proteínas objeto de estudio a estos dominios en los plásmidos pGBT9 (que expresa el dominio BD) y pGAD424 (que expresa el dominio AD). Ambos plásmidos se cotransformaron en la misma cepa (Y190), cuyos genes reporteros son *lacZ* e *HIS3*. Previamente, este sistema había sido utilizado por Flández y colaboradores (2004) para describir la interacción entre Msg5 y Slt2. Este sistema en concreto no fue útil para las otras MAPKs, ya que los valores de actividad β -Galactosidasa obtenidos entre Msg5 y Kss1 o Fus3 eran muy bajos, especialmente en el caso de Fus3.

Por ese motivo, decidimos estudiar la interacción utilizando otra variante de este sistema que ya había sido probado eficazmente como fruto de una colaboración con el Prof. Steve Keyse en la Universidad de Dundee en Escocia. La diferencia fundamental se basa en que en este caso, cada uno de los plásmidos (pGBKT7 y pGADT7, distintos a los utilizados en el anterior sistema) se transforma en dos cepas de tipo sexual opuesto. Induciendo el apareamiento logramos que ambas proteínas se expresen en la misma célula diploide y posteriormente se determina la interacción tal y como se explica en el apartado de materiales y métodos. Además este fondo genético posee algún gen reportero adicional a los que presenta la cepa Y190 (como *ADE2*), lo que permite tener otro marcador para valorar la interacción. Por

todo ello, en los experimentos que describimos a continuación se utilizó esta variante del sistema de dos híbridos.

4.1. El extremo N-terminal regulatorio de Msg5 interacciona con las MAPKs Fus3, Kss1 y Slt2

Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación habían definido que la región amino-terminal no catalítica de Msg5 es la que media la interacción con la MAPK Slt2 (Flandez *et al.*, 2004). Sin embargo, no se conocían con exactitud los residuos implicados en esta unión, ni tampoco las regiones de esta fosfatasa que establecían su interacción con otras MAPKs como Fus3 y Kss1. Los experimentos de copurificación descritos en el apartado 3.1. indicaban que Msg5 interacciona con Fus3 y Kss1 y que la forma corta de Msg5, carente de los primeros 45 aminoácidos situados en la región amino-terminal, presenta menos afinidad de unión a Fus3 y Kss1.

En primer lugar, valoramos la interacción de la proteína Msg5 completa con las MAPKs Slt2, Fus3 y Kss1. Para ello se subclonó el marco abierto de lectura de *MSG5* en el vector pGBK-T7 en fase con el dominio de unión a DNA del gen *GAL4*. Este plásmido se transformó en la cepa PJ69-4A. Las distintas MAPKs, *SLT2*, *FUS3* y *KSS1*, se fusionaron al dominio activador de la transcripción del gen *GAL4* en el vector pGAD-T7 y cada uno de estos plásmidos se transformaron por separado en la cepa PJ69-4 α , de tipo sexual opuesto a la anteriormente nombrada. Tras inducir el apareamiento entre ambas cepas, se seleccionaron células diploides con los plásmidos que expresan las proteínas de interés por crecimiento en un medio selectivo carente de leucina (marcador del vector pGAD-T7) y triptófano (marcador del vector pGBK-T7) (**figura 31A**).

En primer lugar se estudió de manera cualitativa la interacción entre dichas proteínas. Dos de los genes cuya expresión está regulada por el factor de transcripción Gal4 en estas cepas, *HIS3* y *ADE2*, son necesarios para la síntesis de histidina y adenina en un medio que carece de estos nutrientes. Pudimos así valorar cualitativamente la interacción de Msg5 con las tres MAPKs tras sembrar estas células en un medio selectivo carente además de histidina y adenina, de manera que aquellas que fueran capaces de crecer en este medio serían las que expresaran proteínas capaces de interaccionar entre sí. Como se observa en la **figura 31A** las células que expresaban Msg5 con Kss1, Fus3 o Slt2 crecieron en el medio deficiente en leucina, triptófano, adenina e histidina, lo que indica que Msg5 interacciona con cada una de ellas.

Posteriormente, tras el crecimiento de estas células en medio líquido, se valoró mediante ensayo de dos híbridos cuantitativo la interacción de dichas proteínas utilizando ONPG como sustrato. Como consecuencia de la interacción entre ambas proteínas, el complejo formado induce la expresión, entre otros, del gen *lacZ*, cuya expresión esta regulada por el factor de transcripción Gal4 en esta cepa. Este gen codifica para la enzima β -Galactosidasa, enzima que al hidrolizar el ONPG produce una coloración amarilla en la medio de reacción.

Como control negativo se utilizó el plásmido vacío que porta el dominio de unión a DNA del gen *GAL4* junto con las MAPKs unidas al dominio de activación y a la inversa, *MSG5* fusionado al dominio de unión junto con el plásmido vacío PGAD-T7. Ambos valores se restaron a los obtenidos de la interacción de cada una de las MAPKs con Msg5. Los resultados reflejados en la **figura 31B** muestran que la interacción de Msg5 con Kss1, y especialmente con Fus3 es menos intensa que la observada con Slt2.

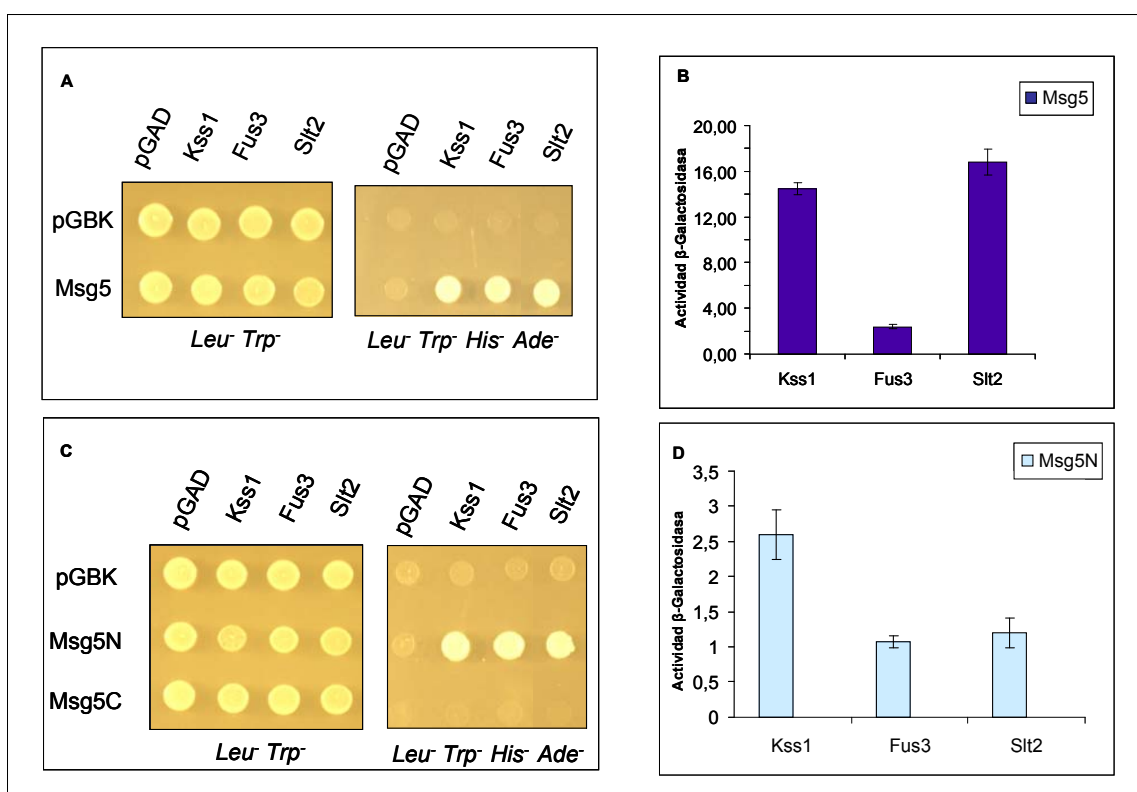


Figura 31. Ensayo de interacción de Msg5 con las MAPKs Kss1, Fus3 y Slt2 mediante el sistema de dos híbridos. La cepa PJ69-4A se transformó con los plásmidos PGBK-T7 o PGBK-T7-MSG5 (**A y B**) así como con PGBK-T7-MSG5ΔC o PGBK-T7-MSG5ΔN (**C y D**). La cepa PJ69-4α se transformó con los plásmidos PGAD-T7, PGAD-T7-KSS1, PGAD-T7-FUS3 o PGAD-T7-SLT2. Tras el apareamiento de ambas cepas, se seleccionaron las células diploides que expresaban las proteínas indicadas en la figura por crecimiento en placa en un medio carente de leucina y triptófano. Se analizó la interacción entre dichas proteínas cualitativamente mediante el estudio de crecimiento en un medio carente de leucina, triptófano, histidina y adenina. También se analizó la actividad β-Galactosidasa de los extractos de las células diploides seleccionadas. Los resultados se indican en unidades de actividad β-Galactosidasa (**B y D**).

Como ocurre en la mayoría de las DUSPs, Msg5 se compone de un dominio regulatorio amino-terminal y un dominio catalítico carboxilo terminal. Para conocer la región de la fosfatasa que media la interacción con Fus3 y Kss1, se utilizó el mismo sistema, subclonando esta vez los fragmentos de Msg5 correspondientes a la región amino y carboxilo en el vector pGBK-T7 y siguiendo el mismo procedimiento detallado anteriormente.

Comprobamos que el extremo N-terminal regulatorio de Msg5 (que incluye los primeros 245 aminoácidos) es el responsable de la interacción de Msg5 con Fus3 y Kss1 al igual que

ocurre con Slt2, ya que las células que portan este fragmento junto con las MAPKs crecen en el medio selectivo sin adenina e histidina (**figura 31C**). Además, en el caso del fragmento C-terminal de Msg5, no se obtienen valores de actividad β -Galactosidasa por encima de los controles negativos. Sin embargo, los niveles de interacción son mucho menores a los observados en presencia de la versión completa de Msg5.

Este resultado coincide con lo descrito hasta ahora sobre otras proteínas fosfatasa de especificidad dual en las que la región amino-terminal de la proteína es la responsable de la interacción con MAPKs (Kondoh & Nishida, 2007).

4.2. Msg5 interacciona con Fus3 y Kss1 utilizando una región distinta a la utilizada con Slt2

Con el objetivo de definir con mayor precisión la región de Msg5 implicada en la interacción con las distintas MAPKs, se realizaron ensayos de dos híbridos utilizando distintas versiones truncadas en la región amino-terminal de Msg5. Las secuencias de *MSG5* que codifican para las versiones truncadas fueron fusionadas al dominio de unión del gen GAL4 en el plásmido pGBK-T7 (**figura 32A**). Por otra parte *SLT2*, *FUS3* y *KSS1* se fusionaron al dominio de activación del DNA. Se transformaron en dos cepas de tipo sexual opuesto y se obtuvo el diploide que contenía los dos tipos de plásmidos.

Como se observa en la **figura 32A**, las células que expresaban la versión de Msg5 deletionada en los primeros 125 aminoácidos de Msg5 (Msg5¹²⁶⁻⁴⁸⁹) junto con cada una de las MAPKs (Slt2, Fus3 o Kss1), no crecieron en el medio selectivo deficiente en leucina, triptófano, adenina e histidina. Esto indica que esta región es necesaria para que se produzca la interacción de Msg5 con cualquiera de las MAPKs ensayadas; de hecho, la presencia en la célula de la forma de Msg5 que comprende únicamente los primeros 125 aminoácidos (Msg5¹⁻¹²⁵) es suficiente para permitir a las células crecer en el medio selectivo junto con Slt2, Fus3 o Kss1.

Estos resultados se confirmaron al cuantificar la intensidad de interacción, valorando la actividad β -Galactosidasa en estas mismas células que coexpresaban las distintas versiones de Msg5 con las diferentes MAPKs tras su crecimiento en medio líquido (**figura 32B**). Como hasta ahora, en este tipo de ensayos observamos que la intensidad de interacción de Msg5 con la MAPK Slt2 es mayor que con Kss1 y especialmente con Fus3, ya que éstas últimas presentan unos valores menores de actividad β -Galactosidasa. Cuando se expresa Msg5¹⁻¹²⁵ con cada una de las MAPKs se alcanzan altos valores de actividad β -Galactosidasa, mayores incluso de los observados con la proteína completa. Por el contrario, si se expresa la versión carente de los primeros 125 aminoácidos (Msg5¹²⁶⁻⁴⁸⁹) con las MAPKs, prácticamente no se detecta actividad β -Galactosidasa. Por tanto, estos resultados indican que los primeros 125 aminoácidos son los responsables de establecer la interacción de Msg5 con cada una de las MAPKs.

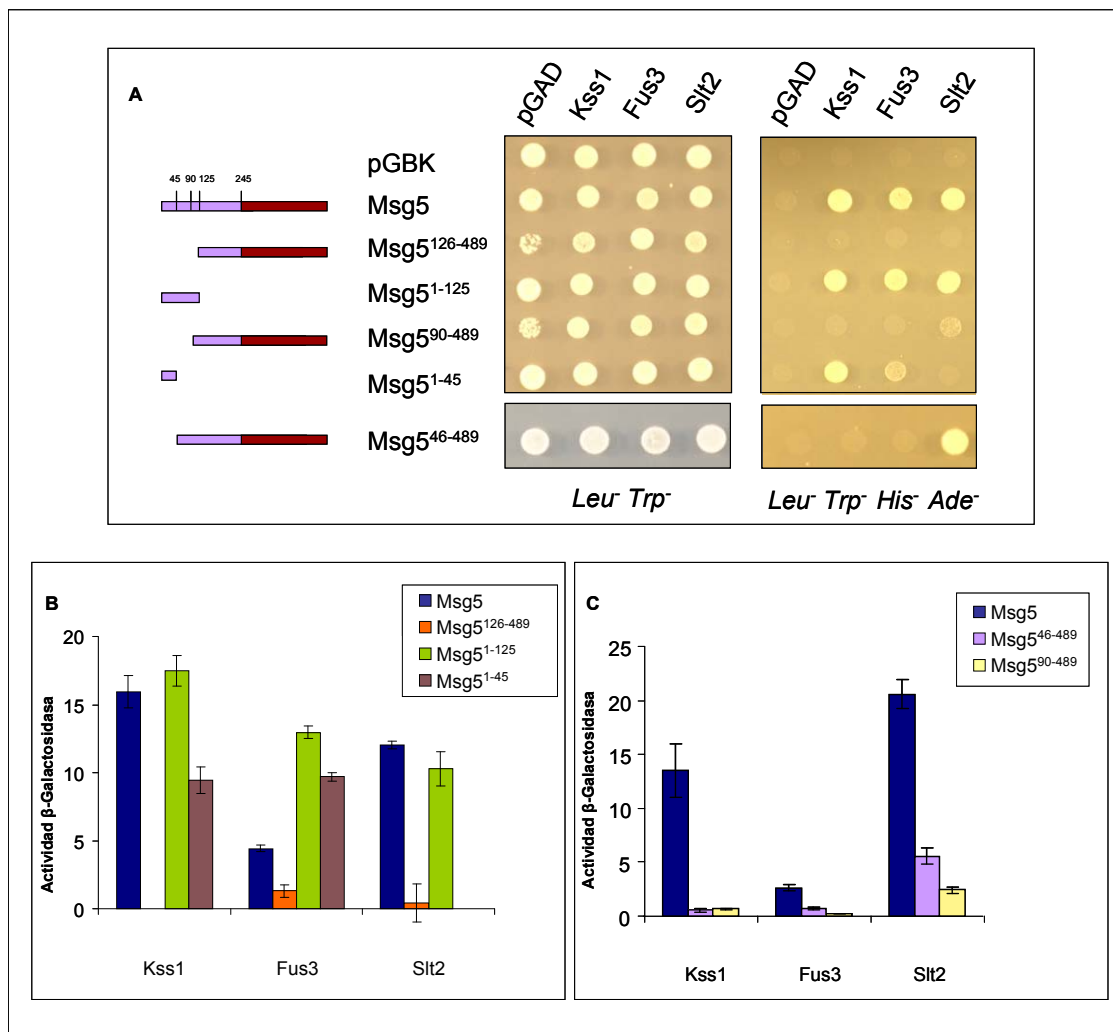


Figura 32. Ensayo de interacción de distintas versiones truncadas de Msg5 con las MAPKs Kss1, Fus3 y Slit2 mediante el sistema de dos híbridos. La cepa PJ69-4A se transformó con el plásmido PGBK-T7, PGBK-T7-MSG5, PGBK-T7-MSG5¹²⁶⁻⁴⁸⁹, PGBK-T7-MSG5¹⁻¹²⁵, PGBK-T7-MSG5¹⁻⁴⁵, PGBK-T7-MSG5⁴⁶⁻⁴⁸⁹ o PGBK-T7-MSG5⁹⁰⁻⁴⁸⁹. La cepa PJ69-4α se transformó con los plásmidos PGAD-T7, PGAD-T7-KSS1, PGAD-T7-FUS3 o PGAD-T7-SLT2. Tras el apareamiento de ambas cepas, se seleccionaron las células diploides que expresaban las proteínas indicadas en el esquema por crecimiento en un medio carente de leucina y triptófano. **(A)** Se analizó la interacción entre dichas proteínas cualitativamente mediante el estudio de crecimiento en un medio carente de leucina, triptófano, histidina y adenina y **(B y C)** cuantitativamente mediante el análisis de la actividad β-Galactosidasa de los extractos de las células diploides seleccionadas.

El crecimiento en el medio selectivo de la **figura 32A** muestra que una versión de Msg5 carente de los 45 primeros aminoácidos (Msg5⁴⁶⁻⁴⁸⁹) interacciona con Slit2 mientras que no lo hace con Fus3 o Kss1. Es importante mencionar que esta versión es semejante a la isoforma corta de Msg5 (Msg5⁵) que también carece de los 45 primeros aminoácidos, y que muestra baja afinidad de unión a las MAPKs Fus3 y Kss1 mediante ensayos de copurificación (ver apartado 3.1). Por tanto, ambos resultados indican que la pequeña región que abarca los primeros 45 aminoácidos resulta esencial para la unión de Msg5 con Fus3 y Kss1, mientras que no es necesaria para que se produzca la interacción con Slit2. De hecho, esta región (Msg5¹⁻⁴⁵)

es suficiente para interaccionar con Kss1 y con Fus3, ya que se observa crecimiento en el medio selectivo, mientras que no se aprecia interacción con Slt2 (**figura 32A**).

La actividad β -Galactosidasa cuantificada en presencia de Msg5¹⁻⁴⁵ y de Fus3 y Kss1 se corresponde con el crecimiento observado en medio sólido selectivo. Por el contrario, no se detecta actividad β -Galactosidasa cuando esta versión se expresa en la célula junto a Slt2, lo cual confirma que los 45 primeros aminoácidos de Msg5 no están implicados en la interacción con Slt2 (**figura 35B**). Además, en la **figura 35C** se observa que cuando se elimina esta pequeña región (Msg5⁴⁶⁻⁴⁸⁹) apenas hay actividad β -Galactosidasa en presencia de Fus3 y Kss1, mientras que en el caso de Slt2 se detecta actividad β -Galactosidasa, si bien se observa una reducción de dicha actividad con respecto a la proteína completa.

Al expresar una versión de Msg5 deleccionada en los primeros 89 aminoácidos (Msg5⁹⁰⁻⁴⁸⁹) junto a Slt2 observamos que el crecimiento en el medio selectivo es menor que cuando faltaban los 45 primeros aminoácidos (Msg5⁴⁶⁻⁴⁸⁹). Como se deduce de la ausencia de crecimiento reflejado en la **figura 32A**, la versión Msg5⁹⁰⁻⁴⁸⁹ no interacciona con las MAPK Fus3 y Kss1, lo cual era previsible a raíz de los resultados obtenidos en ausencia de los 45 primeros aminoácidos.

Estos ensayos se completaron cuantificando el valor de esta interacción. Cuando la versión de Msg5 carente de los 89 primeros aminoácidos se expresa con Slt2, se sigue detectando actividad β -Galactosidasa, pero está más reducida aún de lo que disminuye cuando Msg5 carece de los 45 primeros aminoácidos, lo que podría indicar una menor unión a Slt2, y por tanto sugiere la participación de la zona del residuo 45 al 90 en la interacción entre Msg5 y Slt2 (**figura 32C**).

Por tanto, podemos concluir que los primeros 125 aminoácidos presentes en la secuencia de Msg5 son los responsables de establecer la interacción de esta fosfatasa con las tres MAPKs, siendo únicamente los primeros 45 aminoácidos de la secuencia de esta fosfatasa esenciales para mediar la unión a las MAPKs Fus3 y Kss1, mientras que son prescindibles para la interacción con Slt2. Sin embargo, la región de Msg5 que abarca los residuos 45-125 es necesaria para establecer la unión con Slt2, lo cual evidencia que Msg5 utiliza distintas regiones para interaccionar con Fus3 y Kss1 que las que usa con Slt2.

4.3. Caracterización de los dominios de unión (dominios *D*) de Msg5 a las MAPKs Fus3, Kss1 y Slt2

4.3.1. Identificación de la secuencia aminoacídica de dos dominios de unión a MAPKs (dominios *D*) de Msg5

Como ya explicamos en la introducción, se ha descrito un tipo de dominio presente en las DUSPs implicado en la unión a las MAPKs (Bardwell *et al.*, 2003; Tanoue & Nishida, 2003), también presente en MKKs, tirosín fosfatasas y en sustratos de MAPKs. Estos dominios contienen la secuencia consenso [(K/R)₁₋₃-X¹⁻⁶- ϕ -X- ϕ] (donde ϕ es un residuo hidrofóbico),

que consiste en un grupo de aminoácidos cargados positivamente seguidos del motivo L/I-X-L/I en un entorno hidrofóbico. Este dominio es la zona responsable de la unión al dominio CD (*Common Docking*) de las MAPKs (Biondi & Nebreda, 2003).

Al analizar la secuencia de aminoácidos de Msg5 encontramos en su región amino-terminal la secuencia de un posible dominio *D* al que nos referiremos como MD1 (*Msg5 Docking 1*). Este dominio está formado por la secuencia ²⁸NRNTKNLSLDI³⁸, y presenta homología con otros dominios encontrados en proteínas que interaccionan con MAPKs por presentar un motivo básico y un motivo LXL característico de la secuencia de los dominios *D* (**figura 33**).

Proteína	Dominio <i>D</i> (K/R) ₁₋₃ -X ₁₋₆ -Φ-X-Φ
GnaQ	RDARRE L KL
Ste7	RRNLK G LNL
Dig1	GRVPAP L NL
Sap1	KKPK- L GL
JunB	KLLK P SLAV
Elk1	KRKPR D LEL
Msg5 (MD1)	RNTKN-LSL

Figura 33. Comparación de la secuencia de los dominios *D* presentes en proteínas que interaccionan con MAPKs con la identificada en la secuencia de Msg5 (MD1). Aparece indicada la secuencia consenso del dominio *D*, estando los residuos básicos en azul y subrayados, y los residuos hidrofóbicos del motivo Φ-X-Φ en rojo.

También dentro de la región amino-terminal de Msg5 existe un motivo ⁹³LSMRRSEASIYTL¹⁰⁵, similar a la de dominios tipo *KIM* o dominios *D* presentes en tirosín fosfatasas como PTP-SL, HePTP o STEP y al que a partir de ahora denominaremos MD2 (*Msg5 Docking 2*). Como se observa en la **figura 34** este posible dominio se compone fundamentalmente de residuos básicos (dos argininas) en un entorno hidrofóbico. Al igual que ocurre con el dominio MD1, la secuencia del MD2 no coincide plenamente con la secuencia consenso de los dominios *D*; en este caso, si bien carece del submotivo hidrofóbico LXL, si posee dos aminoácidos hidrofóbicos separados por dos residuos aminoácidos en vez de uno; de cualquier forma, no es necesaria la presencia del dominio consenso completo para que se produzca la interacción con las MAPKs (Masuda *et al.*, 2003).

Fosfatasa	Dominio <i>D</i> (K/R) ₁₋₃ -X ₁₋₆ -Φ-X-Φ
PTP-SL	GLQE R RRGSNVS L TL
HePTP	RLQE R RRGSNVAL M L
STEP	GLQE R RRGSNVS L TL
Msg5 (MD2)	LSMRRSEASIYTL

Figura 34. Comparación de la secuencia de los dominios *docking* presentes en las tirosín fosfatasas de mamífero con la identificada en la secuencia de Msg5 (MD2). Aparece indicada la secuencia del dominio *D*, estando los residuos básicos en azul y subrayados, y los residuos hidrofóbicos del motivo Φ-X-Φ en rojo.

4.3.2. Kss1 y Fus3 interaccionan con Msg5 a través del primer dominio docking (MD1) identificado en esta fosfatasa

Con el objetivo de estudiar el papel que desempeñan cada uno de estos dominios (MD1 y MD2) en la unión a las MAPKs, analizamos el efecto que producía su mutación en la interacción con Slt2, Fus3 y Kss1. Para ello primero se sustituyeron por alanina los residuos esenciales de los dos posibles dominios de interacción en Msg5: las leucinas 34 y 36 del MD1 (Msg5^{MD1}) y las argininas 96 y 97 del MD2 (Msg5^{MD2}). Se obtuvieron así las distintas versiones mutantes de Msg5, a las que denominaremos Msg5^{MD1} y Msg5^{MD2} respectivamente (**figura 35**).

Mutantes Msg5	Dominios <i>D</i> mutados
Msg5 ^{MD1}	³⁰ RNTKN- ASA ³⁶
Msg5 ^{MD2}	⁹³ LSM AA SEASIYTL ¹⁰⁵

Figura 35. Secuencia de los dominios *D* mutados de Msg5. Aparece indicada la secuencia del dominio *D* en la que se muestra en color rojo la posición de las alaninas introducidas en sustitución de los posibles residuos esenciales de los dominios estudiados.

Como ya explicamos al comienzo del apartado 4, inicialmente utilizamos el sistema de dos híbridos basado en los plásmidos pGBT9 y pGAD424 por haber sido empleado previamente por nuestro grupo en el análisis de la interacción entre Msg5 y Slt2. En este caso *MSG5* y sus versiones mutadas en MD1 y MD2 se fusionaron al dominio de unión al DNA en el vector pGBT9. Las MAPKs se fusionaron al dominio activador de *GAL4* en el plásmido pGAD424. Como control negativo se utilizaron ambos vectores vacíos. Como se indica en la **figura 36**, se cotransformó cada versión de Msg5 con cada una de las MAPKs en la cepa Y190. Esta cepa además de *lacZ* como gen reportero, tiene el gen *HIS3*, lo cual es útil para valorar cualitativamente la interacción entre proteínas en un medio carente de este aminoácido. Uno de los problemas de esta técnica es que muchas veces aparecen falsos positivos debido a una expresión basal del gen *HIS3*. Para evitar que esto suceda, los clones seleccionados se sembraron en un medio selectivo deficiente en leucina, triptófano e histidina en presencia de 3-amino-triazol (3-AT) (inhibidor del producto de *HIS3*) en gradiente de concentración de 0 a 150nM (**figura 36A**).

Observamos que, a cualquier concentración de 3-AT, los transformantes que expresan Slt2 con las versiones mutadas en Msg5 en MD1 y MD2 presentan un crecimiento similar al que muestran los que expresan la versión silvestre de Msg5. Es decir, las mutaciones de ninguno de los posibles dominios *D* afectan a la interacción que esta fosfatasa establece con Slt2. Sin embargo, en presencia de altas concentraciones de 3-AT, tanto los transformantes que expresan Kss1 como Fus 3 junto con Msg5^{MD1} no crecen, a diferencia de lo que ocurre cuando la célula expresa cualquiera de estas dos MAPKs con Msg5 o Msg5^{MD2}. Esto indica que Kss1 no interacciona con Msg5^{MD1}.

Completamos estos ensayos mediante la valoración cuantitativa de la interacción (**figura 36B**). Los valores de actividad β -Galactosidasa obtenidos de los transformantes que portaban Msg5 con las MAPKs Fus3 y Kss1 son muy bajos utilizando este sistema como ya se indicó al comienzo del apartado 4, lo que no nos permite una cuantificación comparativa de la interacción entre estas MAPKs con las diferentes versiones de Msg5. En cuanto a la MAPK Slt2, ninguna de las mutaciones individuales de los dominios *D* de Msg5 reduce de manera significativa la interacción MAPK-fosfatasa.

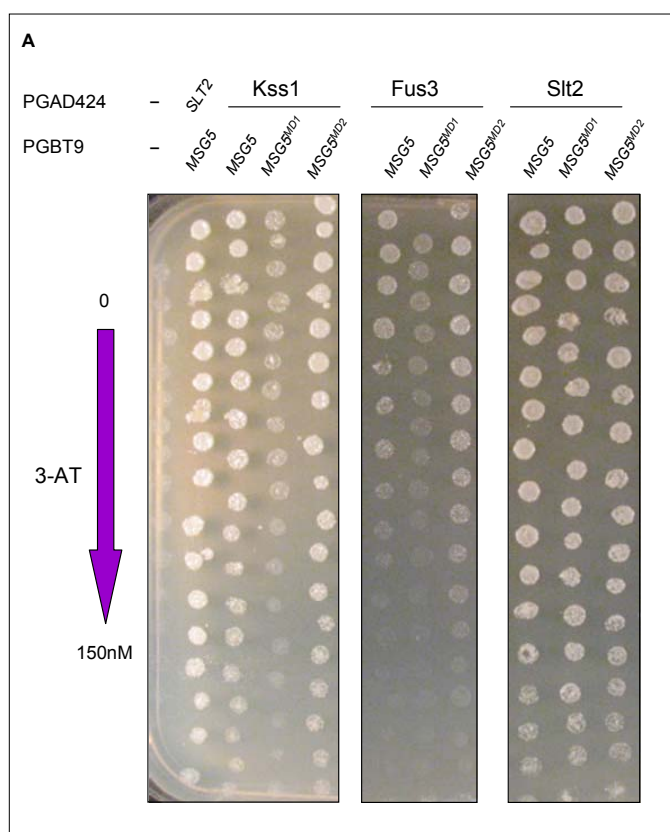
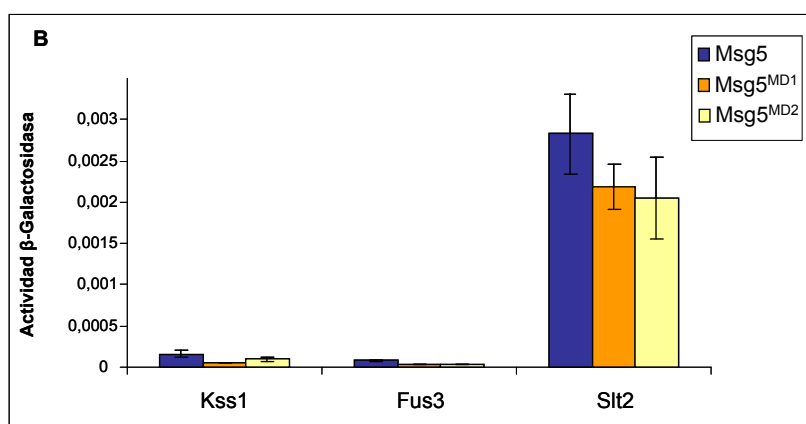


Figura 36. Ensayo de interacción de diferentes versiones mutadas en los dominios *D* de Msg5 con las MAPKs Kss1, Fus3 y Slt2 mediante el sistema de dos híbridos en células haploides. La cepa Y190 se cotransformó con los plásmidos que portan los fragmentos que se indican en la figura A, estando las versiones de *MSG5* clonadas en el vector pGBT9 y las *MAPKs* en el vector pGAD424. Como control negativo se emplearon los vectores vacíos (-).

(A) Valoración cualitativa de la interacción en un medio carente de leucina, triptófano e histidina y suplementado 3-aminotriazol en gradiente de concentración de 0 a 150nM. **(B)** Se realizó el ensayo cuantitativo sobre los extractos de estas células y se valoró la actividad β -Galactosidasa utilizando como sustrato ONPG.



En función de los resultados obtenidos con este sistema, decidimos subclonar las distintas versiones de *Msg5* mutadas en los plásmidos pGBKT7 y pGADT7 para estudiar la interacción mediante esta variante del sistema de dos híbridos.

Para estos estudios, y con el fin de observar algún posible efecto sobre la interacción con *Slt2*, en el caso del motivo MD1 se llevó a cabo la sustitución por alanina no sólo de las leucinas 34 y 36 sino también de los residuos básicos precedentes arginina y lisina situados en las posiciones 29 y 32 respectivamente (*MSG5^{MD1-4}*). En este caso, además de estudiar la interacción de los mutantes individuales de *Msg5* con *Slt2*, *Fus3* y *Kss1*, quisimos analizar el efecto que tendría la mutación simultánea de ambos dominios *D* en la asociación de *Msg5* con estas MAPKs, para lo cual construimos la versión mutante de *Msg5* en ambos motivos MD1 y MD2 (*Msg5^{MD1-4/MD2}*). Es importante destacar que estos dominios de unión están situados en la región considerada como esencial para la interacción con las tres MAPKs, los 125 primeros aminoácidos.

En este experimento, las tres versiones mutantes de *MSG5* se subclonaron en el vector pGBK-T7 en fase con el dominio de unión a DNA del gen *GAL4*. Este plásmido se transformó en la cepa PJ69-4A. Las distintas MAPKs, *SLT2*, *FUS3* y *KSS1*, se fusionaron al dominio activador de la transcripción del gen *GAL4* en el vector pGAD-T7. Como controles negativos se utilizaron cepas transformadas con el plásmido que porta el dominio de unión a *GAL4* vacío junto con las MAPKs unidas al dominio de activación y a la inversa, el plásmido que expresa *MSG5* fusionado al dominio de unión junto con el plásmido pGAD-T7 vacío. En el control positivo *MSG5* estaba unido al dominio de unión y *SLT2* al de activación.

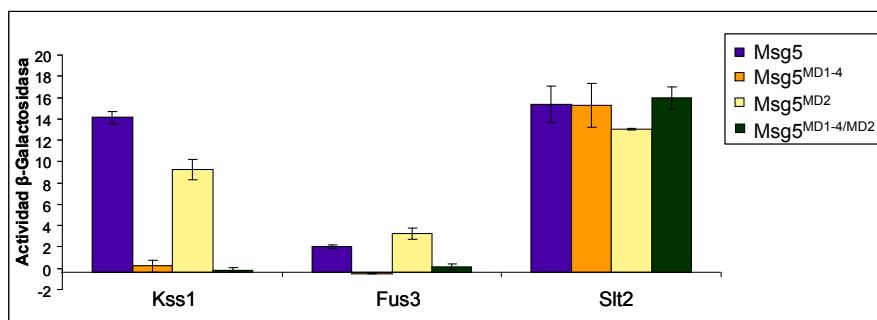


Figura 37. Ensayo de interacción de diferentes versiones mutadas en los dominios *D* de *Msg5* con las MAPKs *Kss1*, *Fus3* y *Slt2* mediante el sistema de dos híbridos en células diploides. La cepa PJ69-4A se transformó con el plásmido pGBK-T7, pGBK-T7-MSG5, pGBKT7-MSG5^{MD1-4}, pGBKT7-MSG5^{MD2} o pGBKT7-MSG5^{MD1-4/2}. La cepa PJ69-4α se transformó con los plásmidos PGAD-T7, PGAD-T7-KSS1, PGAD-T7-FUS3 o PGAD-T7-SLT2. Tras el apareamiento de ambas cepas, se seleccionaron las células diploides que expresaban las proteínas indicadas en la figura mediante crecimiento en un medio carente de leucina y triptófano. Se analizó la actividad β-Galactosidasa de los extractos de las células seleccionadas.

Los resultados mostrados en la **figura 37** confirman la ausencia de interacción de $\text{Msg5}^{\text{MD1-4}}$ con Kss1 y Fus3; sin embargo, apenas se modificaba la actividad β -Galactosidasa de las células que expresan Slt2 y esta versión mutante ($\text{Msg5}^{\text{MD1-4}}$), lo cual confirma que la mutación en MD1 no afecta a la capacidad de interacción de Msg5 con Slt2. Por tanto, este primer dominio *D* identificado en la secuencia de Msg5 es esencial para establecer la unión de Msg5 a Fus3 y Kss1 y sin embargo no está implicado en la interacción con la MAPK Slt2.

Cuando Msg5^{MD2} se expresó junto a Slt2 y Kss1, la actividad β -Galactosidasa se redujo ligeramente, disminución que no se observó en presencia de Fus3 (**figura 37**). Por tanto, estos ensayos confirman los datos obtenidos en medio sólido que indican que el segundo dominio no parece jugar un papel relevante en la unión de Msg5 con ninguna de las MAPKs.

La versión de Msg5 mutada en ambos dominios, $\text{Msg5}^{\text{MD1-4/2}}$, manifestó un comportamiento similar al mostrado por el mutante $\text{Msg5}^{\text{MD1-4}}$: la presencia de la doble mutación en Msg5 no permitió la interacción con las MAPKs Kss1 y Fus3 mientras que la interacción con Slt2 no se vio afectada (**figura 37**).

Adicionalmente, realizamos ensayos de dos híbridos utilizando esta vez la versión truncada de Msg5^{1-125} , que comprende la zona de Msg5 esencial para la interacción con las tres MAPKs mutagenizada en los residuos esenciales de ambos posibles dominios MD1 y MD2 subclonada en el vector PGBK-T7. Como se observa en la **figura 38**, la doble mutación en este fragmento ($\text{Msg5}^{1-125\text{-MD1-4/MD2}}$) eliminaba la interacción con las MAPKs Kss1 y Fus3, mientras que no afectaba a la unión a Slt2.

4.3.3. La integridad del CD en Fus3 y Kss1 es esencial para la interacción con Msg5, mientras que en Slt2 es prescindible

Como ya se había comentado en la introducción, las MAPKs interaccionan con las proteínas que poseen dominios *D* gracias a la presencia de un dominio común localizado en el lado opuesto al centro activo de la proteína y conocido como *Common Docking* (CD). Está formado fundamentalmente por residuos cargados negativamente, que establecen interacciones electrostáticas con los residuos cargados positivamente presentes en el dominio *docking* de activadores, sustratos e inactivadores de la misma (Tanoue *et al.*, 2000).

Esta zona fue identificada inicialmente en un mutante puntual en esta región en la MAPK *rolled* de *Drosophila melanogaster* que presentaba más actividad que la proteína silvestre (Brunner *et al.*, 1994). Esta mutación consistía en la sustitución del aspártico 334 por asparragina (**figura 38**). En el caso de la MAPK ERK2 de mamíferos, se observó que la sustitución del aspártico 319 equivalente daba lugar a una forma hiperactiva de la MAPK (Bott *et al.*, 1994). Posteriormente se pudo confirmar que la mutación análoga a la de la MAPK *rolled* de *Drosophila* en esta región de las MAPKs de mamíferos reduce la unión a MAPKKs, fosfatasa o sustratos con los que se asocia (Chu *et al.*, 1996; Kusari *et al.*, 2004).

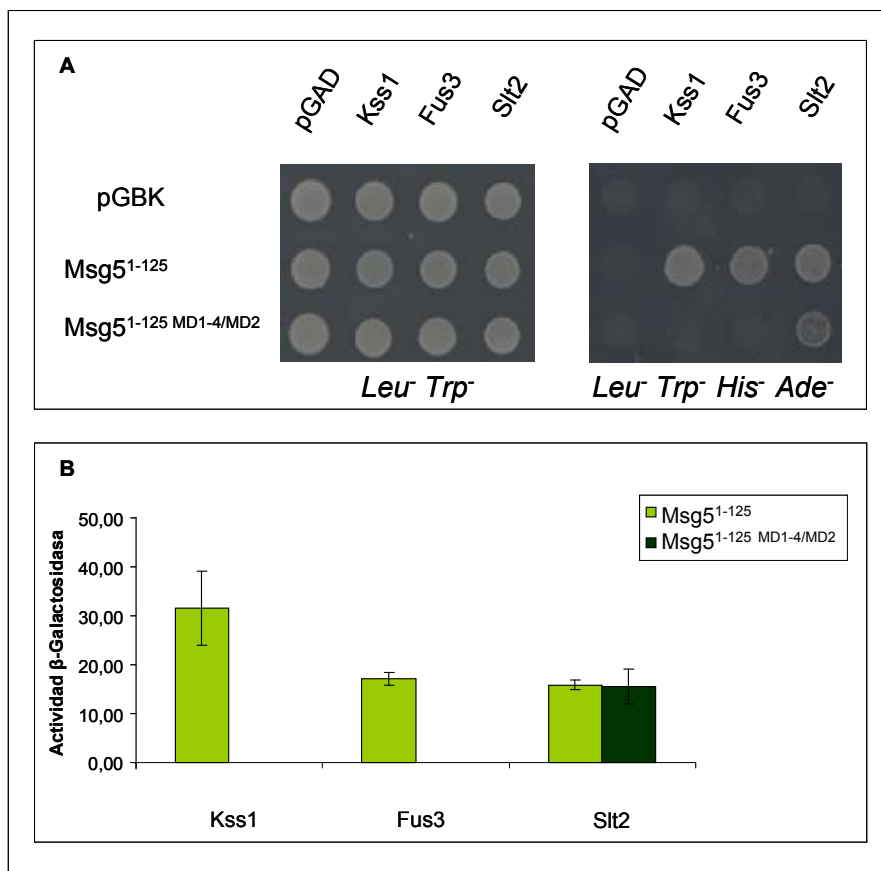


Figura 37. Ensayo de interacción de Msg5¹⁻¹²⁵ mutada en los dos dominios D identificados con las MAPKs Kss1, Fus3 y Slit2 mediante el sistema de dos híbridos. La cepa PJ69-4A se transformó con el plásmido PGBKT7, PGBKT7-MSG5¹⁻¹²⁵ o PGBKT7-MSG5¹⁻¹²⁵ MD1-4/2. La cepa PJ69-4α se transformó con los plásmidos PGADT7, PGAD-T7-KSS1, PGAD-T7-FUS3 o PGAD-T7-SLT2. Tras el apareamiento de ambas cepas, se seleccionaron las células diploides que expresaban las proteínas indicadas en la figura por crecimiento en un medio carente de leucina y triptófano. **(A)** Se analizó cualitativamente la interacción entre dichas proteínas mediante estudio el crecimiento en un medio carente de leucina, triptófano, histidina y adenina y **(B)** cuantitativamente mediante el análisis de la actividad β-Galactosidasa de estas cepas.

Nuestro siguiente objetivo se centró en averiguar la implicación del dominio CD de las MAPKs Slit2, Fus3 y Kss1 en la interacción con Msg5. Para ello analizamos mediante el sistema de dos híbridos la interacción de las versiones de las MAPKs mutadas en el motivo CD con Msg5.

Como se observa en la **figura 38**, el alineamiento de la secuencia aminoacídica de las distintas MAPKs de *S. cerevisiae* con la de ERK2 de mamíferos y con la de la MAPK de *Drosophila melanogaster* revela la presencia de varios residuos conservados en todos los casos. La mutación del segundo residuo de aspártico de la MAPK de *D. melanogaster* es el que determina su hiperactivación.

322	HPYLEQYYDPG D EPV	337	r^{sem} (D.m.)
308	HPYLEQYYDPS D EPI	322	ERK2 (H.s.)
315	HPYLSI WHDPA D EPV	329	Slt2 (S.c.)
306	HPYLQTYHDPN D EPE	320	Fus3 (S.c.)
310	HPYLAMYHDPS D EPE	324	Kss1 (S.c.)

Figura 38. Secuencia aminoacídica del dominio CD de distintas MAPKs.

Alineamiento de la secuencia aminoacídica del motivo CD de las MAPKs *rolled* de *Drosophila melanogaster*, ERK2 de mamíferos, y Slt2, Fus3 y Kss1 de *S. cerevisiae*. Los residuos aminoácidos que han sido mutados en las MAPKs de *S. cerevisiae* aparecen en rojo.

El grupo del investigación del Prof. Steve Keyse en la Universidad de Dundee (Escocia) generó los mutantes en los que se sustituyó el aspártico (D) correspondiente de cada MAPK señalada en la **figura 38** a asparragina (N). En el caso concreto de Slt2 se generó además, una segunda versión de esta proteína en la que los dos residuos homólogos de aspártico y uno de glutámico situados en las posiciones 323, 326 y 327 respectivamente fueron sustituidos por asparragina. De esta manera se obtuvieron las versiones mutadas de las tres MAPKs en el dominio CD.

Como se muestra en la **figura 39**, los mutantes individuales de Fus3 y Kss1 (Fus3^{D317N} Y Kss1^{D321N}) no interaccionan con Msg5, lo que indica el papel esencial del aspártico presente en el *Common Docking* para la interacción de estas MAPKs con la fosfatasa Msg5. Sin embargo, ni el residuo de glutámico 327 ni los residuos de aspártico 323 y 326 conservados en esta región de Slt2 son esenciales para la asociación con Msg5.

En el apartado anterior demostramos que el dominio MD1 identificado en Msg5 está involucrado en la unión con las MAPKs Fus3 y Kss1. Aquí demostramos la necesidad del dominio CD presente en estas MAPKs para interaccionar con Msg5, lo que concuerda con el papel de los motivos CD en la unión con los dominios *D*.

Sin embargo, no hemos encontrado ningún motivo de Msg5 relevante en la interacción con Slt2. Tampoco el dominio CD de la secuencia de Slt2 es esencial para la unión entre ambas proteínas. Ambos resultados sugieren que la asociación Msg5-Slt2 no se caracteriza por estar mediada por dominios *D* que intervienen en las interacciones entre las MAPKs y sus fosfatasa.

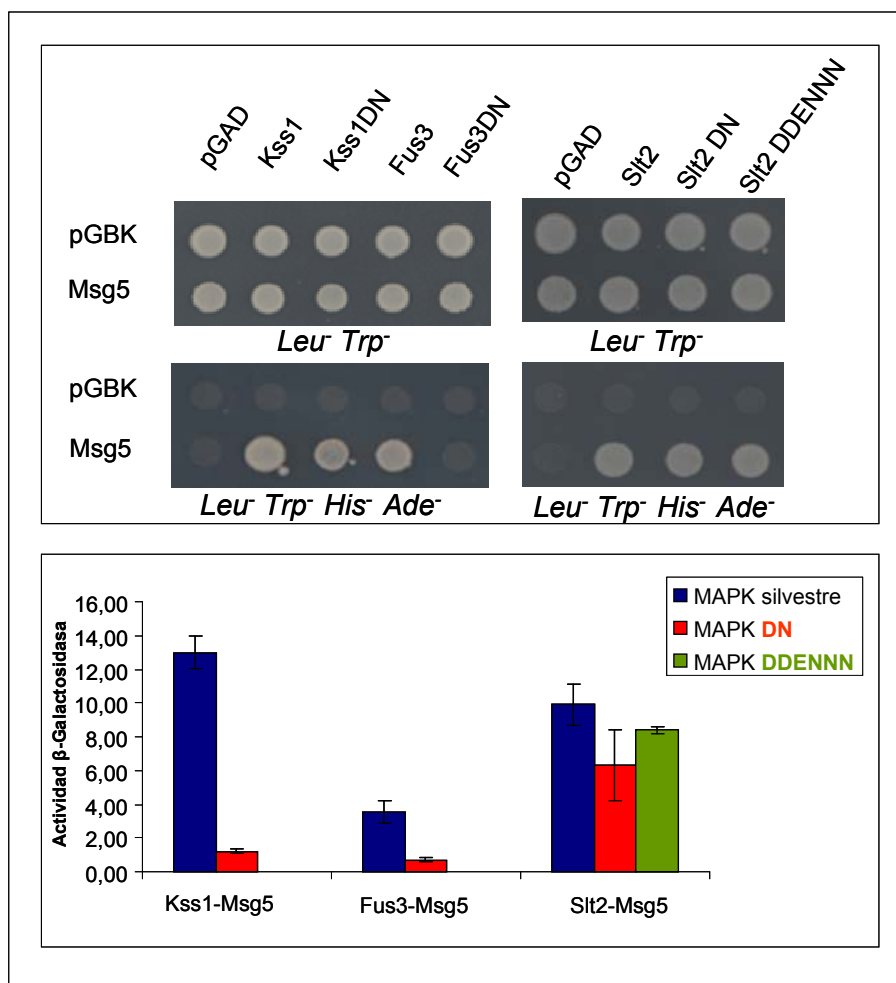


Figura 39. Ensayo de interacción de las MAPKs Kss1, Fus3 y Slit2 mutadas en el *common docking* con Msg5 mediante el sistema de dos híbridos. La cepa PJ69-4A se transformó con el plásmido PGBK-T7 o PGBK-T7-Msg5. La cepa PJ69-4 α se transformó con los plásmidos PGAD-T7 o PGAD-T7-KSS1 o PGAD-T7-KSS1DN o PGAD-T7-FUS3 o PGAD-T7-FUS3DN o PGAD-T7-SLT2 o PGAD-T7-SLT2DN o PGAD-T7-SLT2DDNN. Tras el apareamiento de ambas cepas, se seleccionaron las células diploides que expresaban las proteínas indicadas en la figura mediante crecimiento en un medio carente de leucina e histidina. **(A)** Se analizó cualitativamente la interacción entre dichas proteínas mediante el estudio de crecimiento en un medio carente de leucina, triptófano, histidina y adenina, y **(B)** cuantitativamente mediante el análisis de la actividad β -Galactosidasa de los extractos de las células diploides seleccionadas. Los resultados se indican en unidades β -Galactosidasa.

4.4. Estudio de la repercusión funcional de la mutación de los dominios de interacción identificados

4.4.1. La mutación del primer dominio *D* de Msg5 reduce su acción sobre la MAPK Fus3 tras inducción por feromona y no afecta a la fosforilación de Slit2 en presencia de rojo Congo

Con el fin de estudiar la relevancia funcional de la presencia de los dominios *D* identificados en la región amino-terminal de Msg5, se analizó el efecto que tenía su mutación sobre los niveles de fosforilación de las MAPKs en condiciones de estimulación.

Para ello se transformó una cepa mutante *msg5Δ* (2D-DD1) con los plásmidos centroméricos que expresaban las distintas versiones de Msg5 marcadas con el epítipo myc y bajo el control de su propio promotor: YCplac22*MSG5*, YCplac22*MSG5^{MD1}*, YCplac22*MSG5^{MD2}* o YCplac22*MSG5^{MD1/MD2}*, así como con el vector centromérico vacío, YCplac22. Se cultivaron los distintos transformantes en medio selectivo a 24°C, y en paralelo, se sometieron a la presencia de feromona 50μM durante 15 minutos. Tras la recogida y rotura celular, mediante *Western blotting* se estudiaron los niveles de fosforilación de las MAPKs de cada uno de estos transformantes en las condiciones mencionadas.

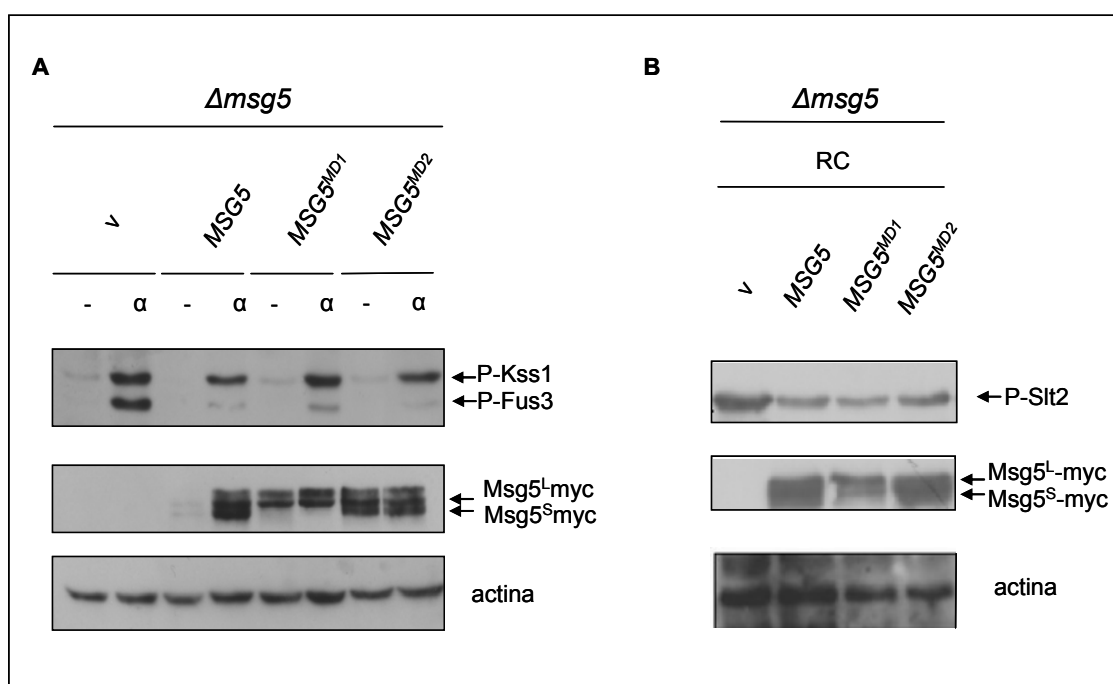


Figura 40. Efecto de la mutación de los dominios D de Msg5 sobre la fosforilación de Fus3 y de Slt2 tras la activación de la ruta de apareamiento y de integridad celular respectivamente. La cepa DD1-2D (*msg5Δ*) se transformó con los plásmidos YCplac22*MSG5*, YCplac22*MSG5^{MD1}* o YCplac22*MSG5^{MD2}* que expresan las proteínas mutadas en los dominios D Msg5^{MD1}myc y Msg5^{MD2}myc respectivamente. Estos transformantes se cultivaron en medio selectivo a 24°C durante toda la noche. **(A)** Se refrescaron los cultivos en medio líquido selectivo, y cuando las células estaban en fase exponencial, se añadió factor alfa 50nM durante 10 minutos. **(B)** Se refrescaron los cultivos en medio rico, y cuando las células estaban en fase exponencial, se añadió rojo Congo 30μg/ml durante 2 horas. Los extractos proteicos obtenido tras el lisado celular se analizaron mediante *Western blotting* con anticuerpos anti-fosfo-p44/42, anti-myc y anti-actina.

Tal y como se puede observar en la **figura 40A**, tras estimulación de la ruta de apareamiento con feromona, se aprecian diferencias entre los niveles de fosforilación de las MAPK Fus3 en presencia de las distintas versiones de Msg5; las células que expresan Msg5 mutada en el primer dominio D (Msg5^{MD1}) los niveles de fosfo-Fus3 y fosfo-Kss1 son ligeramente mayores que los mostrados en presencia de la proteína Msg5 silvestre o de la versión de Msg5 mutada en el segundo dominio D (Msg5^{MD2}). Por lo tanto, el dominio de unión

MD1 de Msg5 participa en la regulación de la fosforilación de la MAPK Fus3 en respuesta a la estimulación de la ruta de apareamiento, ya que media la interacción entre ambas proteínas. Destaca el hecho de que los transformantes que expresan la versión de Msg5 mutada en el dominio MD1, sólo producen la isoforma larga de la proteína y no la isoforma corta.

De manera semejante, estos transformantes, así como otros que expresan la versión de Msg5 mutada en ambos dominios *D*, se trataron con rojo Congo. En la **figura 40B** se observa que en presencia de rojo Congo existen niveles similares de fosfo-Slt2 en las células que expresan Msg5 silvestre y en las que expresan cada una de las versiones de Msg5 mutadas en los dominios *D*. Por lo tanto, ninguno de los dominios *D* identificados en Msg5 juega un papel relevante en la regulación de los niveles de fosforilación de Slt2 tras la estimulación de la ruta de integridad celular por este agente. Este resultado encaja con las observaciones previas que indican que la interacción entre ambas proteínas, Msg5 y Slt2, no esta mediada por la presencia de estos dominios *D* de Msg5.

4.4.2. La mutación de los dominios *D* de Msg5 no afecta a su fosforilación por Slt2 en condiciones de activación de la ruta de integridad celular.

Ya se ha comentado en este trabajo que las dos isoformas de Msg5 son fosforiladas en respuesta a la activación de la ruta de integridad celular por distintos estímulos, y que es la MAPK Slt2 en su forma activa la responsable de esta modificación postraducciona. Esta fosforilación se ha relacionado con la disminución de la afinidad de unión entre Slt2 y Msg5 en condiciones de activación (Flandez *et al.*, 2004).

Hasta ahora, hemos demostrado que la mutación de los dominios *D* presentes en Msg5 (MD1 y MD2) y en Slt2 (CD), no afectan ni a la interacción entre ambas, ni a la funcionalidad de esta MAPK en respuesta a la activación de la ruta a la que pertenece. Sin embargo, no hemos analizado si estas mutaciones afectan a la fosforilación a la que Msg5 se ve sometida tras estimulación de la ruta de integridad celular.

Para lograr este fin, utilizamos los mismos transformantes utilizados previamente que expresan la proteína silvestre Msg5 así como cada una de las versiones mutadas en los dominios *D* de Msg5myc por separado. Estos transformantes se cultivaron en medio mínimo y posteriormente se indujo la activación de la ruta de integridad celular mediante choque térmico a 39°C durante 2 horas. Paralelamente, otro cultivo creció a 24°C y se utilizó como control en condiciones basales. Después se analizó mediante *Western blotting* la presencia de las formas fosforiladas de Msg5 presente en los extractos de las muestras recogidas, usando anticuerpos anti-myc. En la **figura 41** se observa como, en condiciones basales se expresan fundamentalmente las dos isoformas de Msg5 sin fosforilar con tamaños de 85 y 91 KDa. Como ya mencionamos previamente, la mutación de MD1 en Msg5 sólo permite la expresión de la isoforma larga de la fosfatasa. Tras el cambio de temperatura, tanto en la cepa que expresa Msg5 silvestre como en las que expresan las mutaciones en MD1, MD2 o en ambos, se detecta

la presencia de dos bandas de menor movilidad electroforética, aproximadamente de 100 y 107 KDa, correspondientes a las formas fosforiladas de Msg5.

Por tanto, los dominios *D* identificados en Msg5 tampoco desempeñan un papel relevante para que tenga lugar la fosforilación que Slt2 ejerce sobre esta fosfatasa en condiciones de activación.

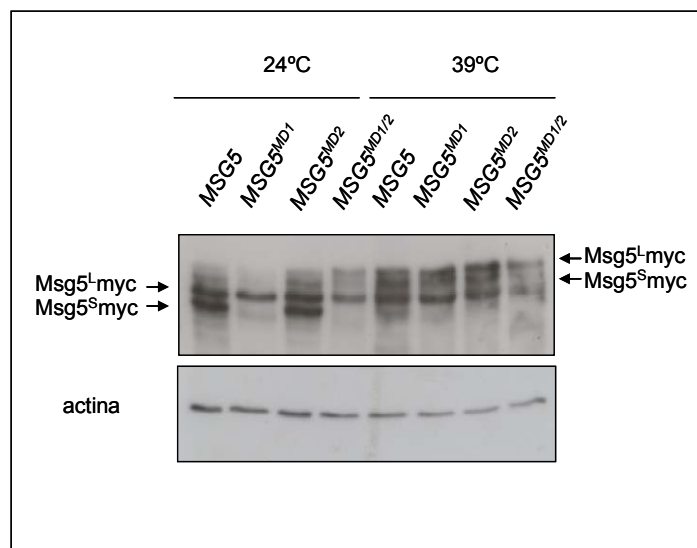


Figura 41. Efecto de la mutación de los dominios *D* de Msg5 sobre la fosforilación de esta fosfatasa por Slt2. La cepa DD1-2D (*msg5Δ*) se transformó con los plásmidos YCplac22MSG5, YCplac22MSG5^{MD1}, YCplac22MSG5^{MD2} o YCplac22MSG5^{MD1/2}, que expresan las proteínas mutadas en los dominios *docking* Msg5^{MD1}-myc, Msg5^{MD2}-myc y Msg5^{MD1/2}-myc respectivamente. Estos transformantes se cultivaron en medio selectivo a 24°C durante toda la noche. Se refrescaron los cultivos y cuando las células estaban en fase exponencial, se sometieron a choque térmico (39°C) durante 2 horas. Los extractos proteicos obtenidos tras el lisado celular se analizaron mediante *Western blotting* con anticuerpos anti-myc y anti-actina.

Discusión

1. SLT2 PRESENTA UNA ESCASA ACTIVIDAD CATALÍTICA EN AUSENCIA DE MSG5

La fosforilación de los residuos de treonina y tirosina conservados del dominio de activación de las MAPKs conduce a su activación, constituyendo por tanto un elemento clave en su regulación. Por este motivo, las proteínas que afectan a esta fosforilación, como las proteínas fosfatasa, ejercen un papel regulatorio clave y su ausencia normalmente conlleva un incremento de la actividad de la MAPK.

La fosfatasa de especificidad dual (DUSP) Msg5, participa en la regulación de MAPKs que operan en distintas rutas de señalización en *Saccharomyces cerevisiae*. Como ya se ha comentado en el trabajo, Msg5 desfosforila a la MAPK de la ruta de integridad celular Slt2 (Flandez *et al.*, 2004) y a la MAPK de la ruta de apareamiento Fus3 (Andersson *et al.*, 2004; Doi *et al.*, 1994), tanto en condiciones basales como de estimulación de cada ruta.

Por ello, resulta sorprendente el hecho de que en células carentes de Msg5, no se detecte un aumento significativo de la actividad de la MAPK de la ruta de integridad celular Slt2, tal y como se refleja en los estudios transcriptómicos y de actividad quinasa llevados a cabo. A pesar de ello, se observan niveles de fosforilación de Slt2 elevados; de hecho son similares o incluso superiores a los que se muestran en otras condiciones que estimulan la ruta de integridad celular desencadenando la activación de Slt2, y por tanto, una respuesta transcripcional plena. En este sentido comprobamos que en mutantes *msg5Δ*, Slt2 fosforilado no tiene capacidad catalítica para inducir una activación eficaz, entre otros, del factor de transcripción Rlm1 que regula la expresión de la mayoría de los genes de respuesta a daño en pared. Este es seguramente el motivo por el que en el análisis transcriptómico observamos menor número de genes y menores niveles de expresión de este grupo funcional de genes (*MLP1*, *CWP1*...) que los mostrados en condiciones de activación de la ruta de integridad, como tras el tratamiento con rojo Congo. La reducida actividad quinasa que muestra Slt2 en ensayos *in vitro* sería también la responsable de que tampoco otros sustratos de Slt2 como Msg5 o Mkk1 (que es retrofosforilado por Slt2 tras activación de la ruta de integridad celular) muestren fosforilación en ausencia de Msg5.

Este es un proceso que ocurre en la célula en otras circunstancias, ya que algo parecido sucede en presencia de cafeína, situación en la que tampoco se observa correlación entre los niveles de fosforilación de la MAPK Slt2 y la inducción transcripcional dependiente del factor de transcripción Rlm1 (Kuranda *et al.*, 2006). Según estos autores, la activación de la ruta de integridad celular en presencia de cafeína es más rápida y potente que la observada tras incubación con otros compuestos como rojo Congo o Blanco de Calcofluor, y sin embargo, la fosforilación de Slt2 en presencia de este agente induce una baja activación transcripcional dependiente de Rlm1 (utilizando como gen reportero *YIL117c::lacZ*). De hecho, en presencia de cafeína, la delección de este factor de transcripción no modifica los niveles de resistencia a la

digestión de la pared celular por enzimas líticas (como zimoliasa), lo cual indica que las modificaciones que se producen en la pared celular por cafeína son independientes de la activación transcripcional dependiente de Rlm1 (Kuranda *et al.*, 2006). También Straede y colaboradores (2007), utilizando una construcción en la que el dominio de unión a DNA de Rlm1 fue sustituido por la secuencia de la proteína bacteriana LexA (Rlm1-lexA), demostraron que en presencia de cafeína no se activa la expresión del reportero *lacZ* cuyo promotor contiene sitios de unión al DNA de *lexA*, lo que indica indirectamente una falta de activación de Rlm1 en dichas condiciones (Straede *et al.*, 2007).

En el presente trabajo, hemos comprobado que la falta de inducción transcripcional dependiente de Rlm1 en presencia de cafeína es consecuencia de la baja fosforilación y por tanto activación de este factor de transcripción por Slt2, tal y como ocurre en mutante *msg5Δ*. Sin embargo, en este caso, a diferencia de lo que ocurre en ausencia de Msg5, Slt2 es capaz de fosforilar a otros sustratos, como Mkk1 y Msg5, lo que indica que la falta de fosforilación es específica de Rlm1 y no debida a una reducida actividad catalítica de la MAPK Slt2 tras tratamiento con cafeína. Esto sugiere que distintos mecanismos son responsables de la ausencia de actividad de Rlm1 en respuesta a cafeína y en células carentes de Msg5. De hecho, parece que la respuesta a cafeína está mediada por otro factor de transcripción regulado por la MAPK Slt2, el complejo SBF (Kuranda *et al.*, 2006).

Todo ello nos lleva a plantearnos la posibilidad de la existencia de mecanismos adicionales a la fosforilación de Slt2 (otras rutas o elementos reguladores) que son necesarios para lograr la activación de Slt2 y con ello, la activación del factor de transcripción Rlm1. Estos mecanismos se pondrían en marcha en condiciones de estimulación desde el exterior celular, pero no en situaciones de ausencia de estímulo, aunque la proteína Slt2 pudiera resultar fosforilada por otras causas, como en este caso, por la ausencia de actividad de una fosfatasa. Así, al faltar Msg5 en la célula, la participación o activación de estos mecanismos que favorecen la respuesta dependiente de Rlm1 podría no ocurrir, evitando así que se desencadene una respuesta innecesaria en ausencia de una activación típica de la ruta de integridad celular. Sin embargo, a pesar de no existir estímulos del exterior, la expresión de alelos hiperactivos de componentes de esta la ruta de integridad celular como *MKK1* (Jung & Levin, 1999), *RHO1* o *PKC1* (Roberts *et al.*, 2000) produce una intensa inducción de genes regulados por el factor de transcripción Rlm1. Esto podría explicarse por una fosforilación muy intensa de Slt2, pero también porque en estas situaciones, a diferencia de lo que ocurre en mutantes *msg5Δ*, se activan componentes de esta ruta que actúan de manera previa a la MAPK Slt2. La interacción de estos componentes, u otros activados o reclutados por ellos, podría ser necesaria para que Slt2 tomase una determinada conformación que le permitiera ser activa. De hecho, estos componentes de la ruta previos a Slt2 no sólo actúan en la transmisión del estímulo desde niveles superiores, sino que parece que pueden actuar también como puntos de entrada y de estimulación de la ruta (Harrison *et al.*, 2004).

Sin embargo, también podría suceder que, en mutantes *msg5Δ*, se favoreciera la actuación específica de otros factores que impidan la activación de Slt2. Se sabe que las rutas de transducción de señales pueden recibir estímulos no sólo verticalmente desde la superficie celular, sino también de forma horizontal procedente por ejemplo de otras rutas, y quizá, esto es lo que podría estar pasando en ausencia de Msg5. La falta de Msg5 en la célula conduce a la activación basal de la MAPK Fus3 (Andersson *et al.*, 2004); por ello, pensamos que en mutantes *msg5Δ* en estas condiciones, Fus3 podría actuar regulando negativamente la activación de Rlm1 mediada por la MAPK Slt2 (**figura 42**). Esta posibilidad vendría apoyada por el hecho de que Fus3, en su estado activo, limita la activación de la MAPK Kss1, actuando así como regulador negativo sobre esta MAPK, lo que favorece la especificidad de las rutas (Sabbagh *et al.*, 2001). Sin embargo, Fus3 no parece estar implicada en la regulación negativa de la respuesta mediada por Slt2, ya que en el doble mutante *msg5Δste7Δ* en el que Fus3 no está activo, tampoco se induce la activación del factor de transcripción Rlm1.

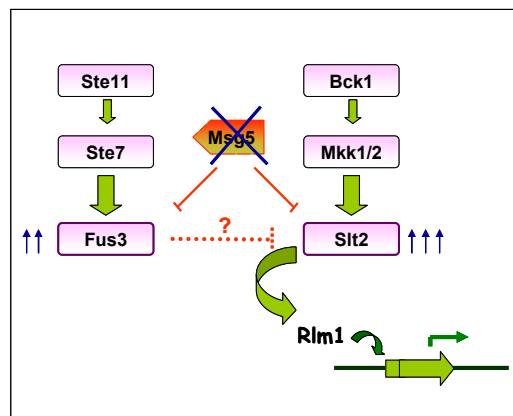


Figura 42. Esquema de la posible regulación negativa que Fus3 ejerce sobre Slt2 en mutantes *msg5Δ*.

Otra posibilidad involucraría a las proteínas Hsp90 y Cdc37 por actuar junto con la MAPK Slt2 en la activación del factor de transcripción Rlm1. Se ha descrito que la chaperona Hsp90 se une exclusivamente a la forma doblemente fosforilada de Slt2 y su función es esencial para que se induzca la activación de Rlm1 (Millson *et al.*, 2005). De hecho, en presencia de una versión mutada de la chaperona Hsp90, la fosforilación de la MAPK Slt2 no se traduce en activación del factor de transcripción Rlm1 (Millson *et al.*, 2005). Asimismo, la participación de la cochaperona Cdc37 en este complejo también es fundamental en el proceso de activación (Hawle *et al.*, 2007). Pensamos por tanto, que la falta de actividad o de expresión de Hsp90 o Cdc37 podría ser la causa de la falta de activación de Rlm1 en ausencia de Msg5. Sin embargo, ni la sobreexpresión de Hsp90 ni de Cdc37 en ausencia de Msg5 inducen la activación del factor de transcripción Rlm1, lo cual parece descartar esta posibilidad.

Se ha descrito otro caso en el que tampoco la fosforilación de Slt2 se traduce en una activación del factor de transcripción Rlm1; ocurre en ausencia de Knr4, una proteína que ha sido propuesta como un elemento más de la ruta de integridad celular que actuaría por debajo de Slt2 (Martin-Yken *et al.*, 2002) y cuya participación es necesaria para lograr la activación regulada por este factor de transcripción. Además, estos autores han comprobado que en ausencia de Knr4, la actividad quinasa *in vitro* de Slt2 utilizando MBP como sustrato es reducida (Martin-Yken *et al.*, 2003). Por tanto, puede que en mutantes *msg5Δ* la actividad de la proteína Knr4 no sea suficiente para lograr una activación significativa de Rlm1.

También se podría hipotetizar que la fosforilación de los residuos de treonina y tirosina del dominio de activación de la MAPK Slt2 que Msg5 desfosforila no sea suficiente para conseguir una plena activación de la MAPK; de manera que, en respuesta a agentes como el rojo Congo, que inducen una activación de Slt2 y una respuesta transcripcional intensa, podrían existir fosforilaciones adicionales en otros residuos de la MAPK que no estarían fosforilados en mutantes *msg5Δ*, y lógicamente, no detectables por el anticuerpo anti-fosfo-p44/42. De hecho, en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, tras la realización de un análisis fosfoproteómico a gran escala (Wilson-Grady *et al.*, 2008), se han detectado sitios de fosforilación en la MAPK Spc1 distintos a los residuos fosforilados convencionales en el dominio de activación. Asimismo, en MAPKs de mamíferos también se han identificado otros sitios de fosforilación adicionales, como son dos residuos en la MAPK JNK2 (uno de ellos fosforilado por PKC) (Pimienta & Pascual, 2007) o un residuo de treonina posterior (T188) al motivo TEY en la MAPK ERK2, el cual es susceptible de autofosforilación por la propia MAPK (Lorenz *et al.*, 2009).

En relación con esto, se han identificado otros procesos que podrían jugar un papel significativo en la activación de las MAPKs, como la dimerización que se induce en ERK2 tras su fosforilación y que regula la traslocación nuclear de la MAPK (Pimienta & Pascual, 2007). Recientemente se ha observado que la dimerización de ERK2, así como la activación y ensamblaje del modulo Raf-MEK-ERK y la fosforilación del motivo TEY de la MAPK son procesos necesarios para que se produzca la autofosforilación del residuo T188 de ERK2 al que antes nos referimos, que favorece la traslocación nuclear de la MAPK y su actividad sobre distintos sustratos nucleares (Lorenz *et al.*, 2009). Por tanto, en base a esto podríamos plantear que, en ausencia de Msg5, y sin la activación de elementos previos, podrían verse afectados procesos similares, lo que consuciría a una escasa actividad de Slt2.

El hecho de que Slt2 posea una región carboxi-terminal distinta a la de otras MAPKs que parece ejerce una función reguladora negativa sobre sí misma (Levin-Salomon *et al.*, 2009), abre también la posibilidad de existencia de fosforilaciones en esta región que, en último término, podrían explicar una ausencia de actividad de la proteína.

Una estrategia que nos permitiría profundizar en la hipótesis de la existencia de otros posibles sitios de fosforilación en Slt2, sería la realización de estudios mediante espectrometría de masas de los péptidos de Slt2 procedentes de mutantes *msg5Δ* y de células tratadas con agentes que inducen la activación de la ruta de integridad.

2. ACTIVIDAD DE MSG5 SOBRE KSS1

El hecho de que Msg5 tenga capacidad de interacción con distintas MAPKs no implica necesariamente que ejerza su actividad fosfatasa de manera similar sobre todas ellas. Hemos demostrado mediante el análisis transcriptómico de mutantes *msg5Δ* y ensayos de fosforilación que Msg5 no regula negativamente a la MAPK Kss1 ni en condiciones basales ni de estimulación, a pesar de los indicios que en un principio sugerían lo contrario, ya que estaba descrito que la sobreexpresión de esta fosfatasa reduce los niveles de fosforilación de Kss1 mostrados en el mutante *pbs2-3*. Además, la sobreexpresión de Msg5 es capaz de suprimir el fenotipo de osmosensibilidad de dicho mutante, pero no del mutante doble *pbs2-3 Kss1Δ* (Davenport *et al.*, 1999). Acorde con esto, los ensayos de copurificación y de dos híbridos descritos en nuestro trabajo, muestran una capacidad de interacción entre ambas proteínas. De hecho, la sobreexpresión de esta fosfatasa, también reduce los niveles de fosforilación de Kss1 inducidos en presencia de zimoliasa y en mutantes *itc1αΔ*, dos condiciones que estimulan su fosforilación.

Sin embargo, el análisis transcriptómico en ausencia de esta fosfatasa, muestra que sólo un gen regulado por Kss1 en condiciones de crecimiento filamentoso (*TS11*) aumenta su expresión. Este gen posee en su promotor secuencias de unión al factor de transcripción específico de la ruta de filamentación Tec1. Además, tan sólo 3 de los genes no relacionados previamente en análisis transcriptómicos con las rutas de Fus3 y Slt2 que aparecen en el perfil transcripcional, *ARG1*, *STP4* y *YGR250C*, han mostrado asociación con el factor de transcripción Tec1 mediante análisis de tipo *ChIP-on-chip* (*YEASTRACT*). Asimismo, observamos que en ausencia de Msg5, no aumentan los niveles de fosforilación de Kss1, ni en condiciones basales ni en situaciones de activación conocidas de esta MAPK (como tratamiento con feromona y butanol). Estaba descrito que Kss1 se activa en procesos de remodelación de la pared celular en mutantes afectados en la síntesis de manoproteínas (Lee & Elion, 1999). Nosotros hemos mostrado que Kss1 también se fosforila en otras situaciones que alteran la pared celular, como en presencia de rojo Congo o zimoliasa. Pero, tampoco en estas condiciones Msg5 regula negativamente la fosforilación de esta MAPK. Recientemente Hao y colaboradores (2008) han descrito que Kss1 (junto con Hog1) también se fosforila tras estimulación osmótica y que sufre así una activación transitoria que promueve adaptación en estas situaciones; por tanto, ésta es una situación en la que queda por ser estudiada la posible regulación de Msg5 sobre Kss1.

Lo que sí hemos detectado es una ligera reducción de los niveles de fosfo-Kss1 en ausencia de Msg5 tanto en condiciones basales como en las condiciones de activación estudiadas. Estos resultados están en la misma línea de los descritos por Andersson y colaboradores (2004), que muestran que en mutantes *msg5Δ* no sólo no se induce la expresión del gen reportero *FRE-lacZ* indicativo de la activación de la ruta regulada por Kss1, sino que incluso se encuentra reducida respecto a la cepa silvestre y como consecuencia de ello, el crecimiento invasivo se encuentra inhibido (Andersson *et al.*, 2004). Esto podría indicar que

Msg5 al interactuar con Kss1, en lugar de inactivarlo, aumentaría su actividad, por ejemplo, provocando indirectamente una mayor fosforilación de esta MAPK.

Otra posible explicación de la interacción mostrada entre Kss1 y Slt2 es que esta asociación tuviese como finalidad que Kss1 modulara la acción de Msg5 como regulador negativo sobre Fus3 o Slt2. De hecho, se sabe que las MAPKs pueden regular por fosforilación a las fosfatasa con las que interactúan, como ocurre en mamíferos con las MAPKs ERK1/2 y las fosfatasa He-PTP y PTP-SL (Zuniga *et al.*, 1999). También en levadura, nuestro grupo de trabajo ha descrito un mecanismo que incluye la fosforilación de Msg5 por la MAPK Slt2 tras la activación de la ruta de integridad celular (Flandez *et al.*, 2004). Sin embargo, en el presente trabajo observamos que la fosforilación que sufre la forma larga de Msg5 (Msg5^L) en presencia de feromona no es debida a la actuación de la MAPK Kss1 sobre esta fosfatasa. Los resultados obtenidos más bien sugieren que es la MAPK Fus3 la que está implicada en la fosforilación de Msg5 en estas condiciones, aunque no descartamos que Slt2 este participando también en este proceso, ya que la cepa carente de esta MAPK también presenta menores niveles de fosfo-Msg5^L. Por tanto, si bien Kss1 podría estar regulando en cierta manera la actuación de Msg5 sobre otras MAPKs mediante su unión a ella (tipo secuestro), no parece que ejerza una función moduladora mediante la fosforilación de esta fosfatasa.

3. ESTUDIO DE LOS DOMINIOS IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN DE MSG5 CON LAS MAPKS

Uno de los aspectos más interesantes de la función de Msg5, al igual que ocurre con otras proteínas fosfatasa homólogas de eucariotas superiores, es su capacidad para regular negativamente distintas MAPKs. Resulta un desafío comprender por qué en las rutas de señalización de MAPKs una misma fosfatasa puede actuar de manera selectiva, en un determinado momento, frente a una MAPK y no frente a otras, así como los mecanismos que regulan esta especificidad de acción. Por todo ello, en este trabajo se ha profundizado en el estudio de los mecanismos moleculares que determinan la interacción de Msg5 con las distintas MAPKs, así como el sentido funcional de la existencia de las dos isoformas de esta proteína.

En primer lugar, mediante estudios de interacción basados en técnicas de copurificación y en el sistema de dos híbridos hemos determinado que cada una de las isoformas de esta fosfatasa interactúan de manera diferente con las MAPKs Fus3, Kss1 y Slt2, como consecuencia de diferencias en la presencia de dominios de unión en cada una de ellas. Así, la presencia del dominio *docking* MD1 (*Msg5 Docking 1*) tan sólo en la isoforma larga de Msg5 (Msg5^L), actúa como un factor que determina la unión específica de la isoforma larga a las MAPKs Fus3 y Kss1. Ya que la isoforma corta de Msg5 (Msg5^S) carece de los 45 primeros aminoácidos de la secuencia de la fosfatasa en los que se encuentra este dominio de unión MD1 a Fus3 y Kss1, esta isoforma presenta una mucha menor afinidad de unión a estas MAPKs.

El dominio *D* suele encontrarse en la zona amino-terminal regulatoria de las proteínas que interaccionan con MAPKs (Tanoue & Nishida, 2003), y está constituido generalmente por tres submotivos: un agrupamiento de residuos básicos (arginina o lisina), una secuencia LXL y un agrupamiento formado por residuos hidrofóbicos (Theodosiou & Ashworth, 2002). Sin embargo, se ha descrito que hay proteínas que presentan dominios *D* incompletos y que, de hecho, estos submotivos pueden actuar por separado como posibles motivos de interacción con MAPKs, siendo asimismo importantes para determinar la especificidad de unión de estas proteínas a las distintas MAPKs. De esta forma, se ha visto en mamíferos que p38 es capaz de fosforilar sustratos que tan sólo presentan el submotivo LXL. También se ha descrito que la DUSP MKP7 posee un dominio I carente también del submotivo LXL que media la unión a ERK y p38 y un dominio II compuesto del submotivo LXL y el submotivo hidrofóbico, necesario para la interacción con JNK y p38 (Masuda *et al.*, 2003).

En la secuencia aminoacídica de la DUSP Msg5 de *S. cerevisiae* hemos identificado la presencia de dos posibles dominios *D* de unión a MAPKs (**figura 43**). Ambos dominios presentan similitud a otros encontrados en proteínas que interaccionan con MAPKs que carecen del dominio consenso completo. Así, MD1 que sólo está presente en la isoforma larga de Msg5, presenta el motivo básico y el motivo LXL característico de los dominio *D*. El dominio MD2 (*Msg5 docking 2*) está presente en ambas isoformas de Msg5 y los dos residuos básicos de arginina constituyen los aminoácidos fundamentales y característicos de este dominio; aunque carece del motivo LXL, posee dos aminoácidos hidrofóbicos (Ile y leu) separados por dos residuos que podrían reemplazarlo funcionalmente.

MQFHSDKQHLDSKTDIDFKPNSPRSLQN**RNTKNLSL**DIAALHPL
MEFSSPSQDVPGSVKFPSPPTPLNLFMKPKPIVLEKCPKVSRRP
TPPSLSM**RRSEAS**IYTLPTSLKNRTVSPSVYTKSSTVSSISKLS
SSSPLSSFSEKPHLNRVHSLSVKTKDLKLGIRGRSQTISGLET
STPISSTREGTLDSTDVNRFSNQKNMQTTLIFPEEDSDLNIDMV
HAEIYQRTVYLDGPLLVLPPNLYLYSEPKLEDILSFDLVINVAK
EIPNLEFLIPPESMAHKIKYYHIEWTHTSKIVKDLSRLTRIHTA
HSQGGKILVHCQCGVSRASLIVAYIMRYYGLSLNDAYNKLKGV
AKDISPNMGLIFQLMEWGTMLSKNSPGEEGETVHMPEEDDIGNN
EVSSTTKSYSSAS**FRS**FPMVTNLSSSPNDSSVNSSEVTPTPAT
LTGARTALATERGEDDEHCKSLSQPADSLEASVDNESISTAPEQ
MMFLP

Figura 43. Secuencia aminoacídica de Msg5. En verde aparecen las dos meteoninas que actúan como comienzos de traducción alternativos y que dan lugar a las dos isoformas de Msg5. En rojo y subrayados aparecen los dos posibles dominios *D* (MD1 en primer lugar y MD2 posteriormente) que muestran similitud a otros dominios *D* identificados en otras fosfatasa. Con fondo gris aparece un motivo que muestra semejanza al motivo de unión FXFP.

En este trabajo demostramos que la presencia del dominio MD1, así como la integridad del *Common Docking* (CD) presente en Fus3 y Kss1 son necesarios para la interacción de estas dos MAPKs con Msg5. Nuestros resultados son complementarios a los obtenidos por Remenyi y

colaboradores (2005), que demostraron mediante ensayos de copurificación que Fus3 y en menor medida Kss1 se unían a un péptido con la secuencia de Msg5 que contenía el dominio que nosotros hemos identificado (MD1). Además, la mutación de este dominio de Msg5 reducía parcialmente los niveles de expresión del gen *FUS1* regulado por la ruta de apareamiento tras estimulación con feromona. Los ensayos bioquímicos y de funcionalidad descritos en nuestro trabajo valorando el nivel de fosforilación de Fus3, la expresión transcripcional dependiente de dicha MAPK, y el porcentaje y morfología de *smhoos* formados en presencia de feromona, ponen de manifiesto que, tras estimulación de la ruta de apareamiento, la actividad ejercida por la isoforma corta Msg5^S (que carece del dominio MD1) o por la versión de Msg5 mutada en MD1 sobre la MAPK Fus3 también es menor que la ejercida por Msg5^L o Msg5 silvestre respectivamente. Estas diferencias no son debidas a la existencia de distinta actividad fosfatasa de cada isoforma de Msg5, ya que ambas isoformas actúan con similar intensidad sobre la MAPK Slt2, de forma que podemos concluir que es consecuencia de la menor interacción con estas MAPKs.

Tanto nuestro trabajo como el llevado a cabo de forma previa por Remenyi y colaboradores (Remenyi *et al.*, 2005) indica que la mutación en el motivo MD1 da lugar a un fenotipo parcial, ya que no elimina totalmente la función de Msg5 sobre Fus3, y sugiere la existencia de motivos de unión a Fus3 redundantes en Msg5. Sin embargo, el otro posible dominio de unión que hemos identificado en la región amino-terminal de Msg5, MD2, no ejerce ningún papel relevante en la interacción de Msg5 con Fus3 ni con ninguna de las otras MAPKs ensayadas.

Nuestros resultados indican que, a pesar de que la región amino-terminal de Msg5 es necesaria para la interacción con las distintas MAPKs, tan sólo el dominio MD1 identificado en la región que sólo posee la isoforma larga de Msg5 es esencial para la interacción de esta fosfatasa con Fus3 y Kss1, pero prescindible para la unión a Slt2. De manera similar, se sabe que el dominio D identificado en la fosfatasa MKP1 media la unión a ERK y p38, pero no a JNK, ya que la mutación de las argininas situadas en las posiciones 53-55 de este motivo no afecta a la interacción con JNK, a pesar de que MKP1 muestra capacidad de desfosforilación de las tres MAPKs (Slack *et al.*, 2001). Algo parecido ocurre en el caso de la fosfatasa MKP2, en la que los residuos básicos presentes en su dominio D (R⁷⁴R⁷⁵R⁷⁶) son esenciales para la unión a ERK y p38, y sin embargo, para interaccionar con JNK se piensa que emplea un mecanismo distinto que no involucra ni a este dominio D ni al dominio CD de JNK (Chen *et al.*, 2001). Esto sugiere que, de una forma parecida, en la interacción de Msg5 con Slt2 deben estar implicados sitios de unión distintos al dominio MD1 y MD2 de Msg5. A pesar de no haber definido los motivos exactos que Msg5 emplea para la interacción con la MAPK Slt2, si hemos acotado la zona que está implicada en esta unión, situada entre los aminoácidos situados entre el residuo 45 y 125 de la región amino-terminal de esta proteína.

Trabajos realizados por nuestro grupo habían mostrado que la mutación en el residuo aspártico 326 del dominio CD conducía a una mayor fosforilación de la MAPK, lo que sugería

que este motivo podría estar involucrado en la interacción de Msg5 con Slt2 (Flandez, 2004). Sin embargo, en el presente trabajo hemos demostrado que en la interacción de Msg5 con Slt2 no están implicados tres residuos conservados (dos aspárticos y un glutámico) en la región del CD de la MAPK. Por tanto, la interacción de ambas isoformas de Msg5 con Slt2 no se caracteriza por estar mediada por las interacciones convencionales tipo *docking* entre fosfatasa y MAPKs. Por ello, de la misma forma que deben existir otras regiones en Msg5 importantes para la unión a la MAPK Slt2, otros dominios distintos al CD en la MAPK Slt2 deben estar implicados en la unión a Msg5, como ocurre en la unión entre JNK y MKP2 de mamíferos (Chen *et al.*, 2001).

En la fosfatasa de especificidad dual de mamíferos MKP3, además de un dominio *D*, se ha descrito la presencia de un dominio de unión que posee el motivo FTAP (parecido al motivo FXFP) en la región carboxi-terminal de MKP3, y cuya mutación reduce la afinidad de unión a ERK2 y evita la activación de MKP3 por esta MAPK (Zhang *et al.*, 2003). Aunque en Msg5 no existe una secuencia que coincida totalmente con la del motivo FXFP que se describe en MKP3, en la zona carboxi-terminal se encuentra una secuencia parecida (**FRSFP**) (**figura 43**) que podría intervenir en la unión de Msg5 con las MAPKs. El hecho de que este motivo este situado en la región carboxi-terminal de esta fosfatasa podría explicar la reducción de los niveles de interacción que observamos de la región amino-terminal de Msg5 con las MAPKs, en relación a la proteína completa. Sin embargo, de existir, esta interacción sería muy débil, ya que la zona carboxi-terminal de Msg5 por sí sola no muestra interacción con las MAPKs mediante el sistema de dos híbridos.

También existen ejemplos en mamíferos en los que las MAPKs utilizan otras regiones adicionales al dominio CD. En la MAPK ERK2, el dominio CD es utilizado para mediar la unión al dominio *D* de la fosfatasa MKP3; adicionalmente, mediante análisis mutacionales basados en la estructura de la proteína ERK2 se ha identificado otra región alejada del CD, en la zona de unión a sustrato, que no tiene una estructura específica y en la que una serie de residuos aminoacídicos concretos contribuyen a la unión de ERK2 a MKP3. Esta región también es necesaria para la modulación de la actividad y/o especificidad de las proteínas que interaccionan con ERK2, así como en el proceso de activación de MKP3 por ERK2 (Zhang *et al.*, 2003). También en *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito la presencia de un dominio adyacente al CD en la MAPK Hog1, al que se ha denominado PBD-2. En este caso, ambos dominios están implicados en la activación de la MAPK por la MAPKK Pbs2, y en la interacción de la MAPK con la fosfatasa Ptp2 (Murakami *et al.*, 2008). Se podría hipotetizar que una zona semejante a alguna de éstas en la MAPK Slt2 sea importante para mediar la interacción con la DUSP Msg5.

Nuestro grupo de trabajo ha descrito que Slt2 es capaz de dimerizar probablemente a través de una región de su secuencia rica en glutaminas situada en la región carboxi-terminal de la proteína (Kim *et al.*, 2007). Cabe la posibilidad de que esta región de Slt2 pueda también emplearse para la unión a otras proteínas como Msg5. Para definir si realmente esta región

media la interacción de Slt2 con Msg5, en nuestro grupo de trabajo se están llevando a cabo ensayos de copurificación de estos fragmentos de Slt2 con otros sustratos de la MAPK.

En relación a la presencia de las dos isoformas de Msg5 en la célula, no parece que sea consecuencia de la existencia de dos RNAs mensajeros de Msg5. Así, en el trabajo inicial en el que se clonó Msg5, sólo se detecta una forma mayoritaria de RNAm procedente de Msg5 (Doi *et al.*, 1994), aunque no se puede descartar que los tamaños de los dos RNAm fuesen tan similares que no se puedan diferenciar mediante *Northern-blotting*. Es, por tanto, más probable que ambas isoformas de Msg5 provengan de un único RNAm y que dos comienzos de traducción alternativos den lugar a las dos isoformas de la proteína (Flandez *et al.*, 2004). Una observación interesante proveniente del estudio de Msg5 tras la mutación de los posibles dominios *D*, es que la mutación de las leucinas 34 y 36 presentes en el dominio MD1 de Msg5 provoca la desaparición de la isoforma corta de esta fosfatasa, de forma que se detecta en SDS-PAGE una sola banda correspondiente a la isoforma larga de Msg5. Los nucleótidos que se sustituyen en MD1 se encuentran muy cerca (a unos 30 nucleótidos) de los que codifican la metionina que sirve como comienzo de traducción del RNAm que da lugar a la isoforma corta de Msg5. Por tanto, podríamos pensar que esta mutación provoca una falta de reconocimiento de este segundo inicio de la traducción por el ribosoma y, como consecuencia de ello, tan sólo se genera la isoforma larga de Msg5.

A raíz de los resultados obtenidos en este trabajo, pensamos que el hecho de que Msg5 se exprese en la célula como dos formas de distinto peso molecular podría suponer la existencia de un nivel adicional de regulación sobre las MAPKs, consistente en una diferente actuación de cada una de las isoformas sobre cada una de las MAPKs. Así, tan sólo la isoforma larga de Msg5, gracias a la presencia del dominio MD1, es capaz de interaccionar con Fus3 y Kss1 a través del dominio CD presente en estas MAPKs y de regular a Fus3. El hecho de que la célula produzca una isoforma, Msg5^s, que actúe preferencialmente sobre Slt2 frente a las otras MAPKs, podría ser un mecanismo que asegure la existencia de la actividad fosfatasa de Msg5 sobre esta MAPK en situaciones en las que se incrementa la cantidad de Kss1 y Fus3, como tras estimulación con feromona o en situaciones de pseudofilamentación. Esto podría suponer la existencia de un mecanismo novedoso de regulación de MAPKs por proteína fosfatasas en la levadura *S. cerevisiae*. Es importante destacar que, en mamíferos, también se expresan distintas isoformas de PTPs (como de PTP-SL) o de MKPs (como MKP3) debido, entre otras causas, a la presencia de comienzos alternativos de traducción de la proteína (Chirivi *et al.*, 2004); (Dowd *et al.*, 1998), por lo que este mecanismo podría estar también conservado en eucariotas superiores.

En resumen, los estudios de interacción llevados a cabo en este trabajo indican que la presencia de distintos dominios de unión en cada una de las isoformas de Msg5 sería la responsable de proporcionar la especificidad de sustrato de cada una de ellas hacia las distintas MAPKs. Asimismo, identifican la existencia de una interacción no convencional de Msg5 con Slt2, que, a diferencia de lo que sucede con Fus3 y Kss1, no está mediada por los dominios

docking ni por el dominio CD de las MAPKs. La utilización de distintos mecanismos de interacción podría favorecer la acción de Msg5 de forma específica frente a una determinada MAPK y no al resto, en función de las distintas necesidades de señalización celular, lo que constituye probablemente un mecanismo destinado a aumentar la especificidad de acción que permite a la célula utilizar un elemento regulador común para varias rutas.

Conclusiones

1. El perfil transcripcional global de la respuesta generada en ausencia de Msg5 muestra fundamentalmente inducción de genes regulados por la ruta de apareamiento y de integridad celular, si bien el número y los niveles de inducción de éstos últimos son menores que los que se observan en condiciones de estimulación de esta ruta tras un daño en la pared celular.
2. En condiciones basales, la fosforilación de la MAPK Slt2 ocasionada por la ausencia de Msg5 no conduce a la fosforilación de sus sustratos; entre ellos, no induce una fosforilación significativa del factor de transcripción Rlm1, y por tanto no se obtiene la respuesta transcripcional característica tras la estimulación de la ruta de integridad celular. Asimismo, Slt2 muestra una capacidad catalítica reducida sobre Mkk1 *in vivo* y sobre Msg5 *in vitro*.
3. En presencia de cafeína, no existe correlación entre los niveles de fosforilación de Slt2 y del factor de transcripción Rlm1; sin embargo, si se observa fosforilación de Mkk1 o de Msg5, lo cual indica que, a diferencia de lo que ocurre en ausencia de Msg5, la reducida actividad catalítica es específica sobre Rlm1 y que, por tanto, el mecanismo responsable de este hecho es diferente en respuesta a cafeína y en células carentes de Msg5.
4. Los mutantes *msg5Δ* no muestran un aumento en los niveles de fosfo-Kss1 con respecto a la cepa silvestre ni en condiciones basales, ni en condiciones de activación de Kss1 como son la exposición a feromona, butanol, rojo Congo o zimoliasa.
5. La isoforma corta de Msg5 (Msg5^S) se une con menor afinidad que la isoforma larga a las MAPKs Fus3 y Kss1, independientemente de la presencia de la forma completa. Consecuentemente, la isoforma corta es menos activa sobre la MAPK Fus3 que la isoforma larga de Msg5.
6. Se ha definido en la región amino-terminal de Msg5 un dominio *D* de unión a MAPKs (MD1). La sustitución por alanina de los residuos fundamentales de este dominio (arginina 29, lisina 32 y leucinas 34 y 36) conduce a la eliminación de la interacción con Fus3 y Kss1, mientras que no afecta a la interacción con Slt2.
7. Se ha identificado otro posible dominio *D* (MD2) en el extremo amino-terminal de Msg5 que no es esencial para la interacción con ninguna de las MAPKs. La sustitución de las argininas 96 y 97 del dominio MD2 por alanina no elimina la interacción con Slt2, Fus3 o Kss1.
8. La presencia de MD1 en Msg5 es importante para la desfosforilación de la MAPK Fus3 en respuesta a feromona. Sin embargo, el dominio MD2 no está implicado en la desfosforilación de ninguna de las MAPKs ensayadas en las condiciones que inducen la estimulación de cada una de ellas.

9. La mutación de los dominios MD1 y MD2 de Msg5 no afecta a su fosforilación por Slt2 en condiciones de estimulación de la ruta de integridad celular.
10. La sustitución por asparragina de los residuos aspárticos 317 y 321 conservados en el motivo de unión (CD) de las MAPKs Fus3 y Kss1 respectivamente, elimina la interacción de cada una de ellas con la fosfatasa Msg5. Sin embargo, en la MAPK Slt2, la sustitución individual del aspártico 326 del CD, o la conjunta de los aspárticos 323, 326 y el gútámico 327 situados en esta misma región, no reduce la unión a Msg5. Todo ello indica que, a diferencia de lo que ocurre con Fus3 y Kss1, la interacción de Slt2 con Msg5 no está mediada por las típicas uniones entre dominios CD y *D* observadas entre otras MAPKs y proteínas fosfatasa.

Bibliografía

- Alberts, A. S. Bouquin, N. Johnston, L. H. & Treisman, R.** (1998). Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J Biol Chem* **273**, 8616-22.
- Alonso, A. Sasin, J. Bottini, N. Friedberg, I. Friedberg, I. Osterman, A. Godzik, A. Hunter, T. Dixon, J. & Mustelin, T.** (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711.
- Andersson, J. Simpson, D. M. Qi, M. Wang, Y. & Elion, E. A.** (2004). Differential input by Ste5 scaffold and Msg5 phosphatase route a MAPK cascade to multiple outcomes. *Embo J* **23**, 2564-76.
- Baetz, K. Moffat, J. Haynes, J. Chang, M. & Andrews, B.** (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol Cell Biol* **21**, 6515-28.
- Bardwell, A. J. Abdollahi, M. & Bardwell, L.** (2003). Docking sites on mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases, MAPK phosphatases and the Elk-1 transcription factor compete for MAPK binding and are crucial for enzymic activity. *Biochem J* **370**, 1077-85.
- Bardwell, A. J. Flatauer, L. J. Matsukuma, K. Thorner, J. & Bardwell, L.** (2001). A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem* **276**, 10374-86.
- Bardwell, A. J. Frankson, E. & Bardwell, L.** (2009) Epub ahead of print. Selectivity of docking sites in MAPK kinases. *J Biol Chem*.
- Bardwell, L.** (2006). Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochem Soc Trans* **34**, 837-41.
- Bardwell, L. Cook, J. G. Chang, E. C. Cairns, B. R. & Thorner, J.** (1996). Signaling in the yeast pheromone response pathway: specific and high-affinity interaction of the mitogen-activated protein (MAP) kinases Kss1 and Fus3 with the upstream MAP kinase kinase Ste7. *Mol Cell Biol* **16**, 3637-50.
- Bardwell, L. Cook, J. G. Inouye, C. J. & Thorner, J.** (1994). Signal propagation and regulation in the mating pheromone response pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev Biol* **166**, 363-79.
- Bardwell, L. & Shah, K.** (2006). Analysis of mitogen-activated protein kinase activation and interactions with regulators and substrates. *Methods* **40**, 213-23.
- Bardwell, L. & Thorner, J.** (1996). A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends Biochem Sci* **21**, 373-4.
- Bermejo, C. Rodriguez, E. Garcia, R. Rodriguez-Pena, J. M. Rodriguez de la Concepcion, M. L. Rivas, C. Arias, P. Nombela, C. Posas, F. & Arroyo, J.** (2008). The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* **19**, 1113-24.
- Biondi, R. M. & Nebreda, A. R.** (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J* **372**, 1-13.
- Blackwell, E. Kim, H. J. & Stone, D. E.** (2007). The pheromone-induced nuclear accumulation of the Fus3 MAPK in yeast depends on its phosphorylation state and on Dig1 and Dig2. *BMC Cell Biol* **8**, 44.
- Bodart, J. F. Chopra, A. Liang, X. & Duesbery, N.** (2002). Anthrax, MEK and cancer. *Cell Cycle* **1**, 10-5.
- Borneman, A. R. Gianoulis, T. A. Zhang, Z. D. Yu, H. Rozowsky, J. Seringhaus, M. R. Wang, L. Y. Gerstein, M. & Snyder, M.** (2007a). Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species. *Science* **317**, 815-9.
- Borneman, A. R. Leigh-Bell, J. A. Yu, H. Bertone, P. Gerstein, M. & Snyder, M.** (2006). Target hub proteins serve as master regulators of development in yeast. *Genes Dev* **20**, 435-48.
- Borneman, A. R. Zhang, Z. D. Rozowsky, J. Seringhaus, M. R. Gerstein, M. & Snyder, M.** (2007b). Transcription factor binding site identification in yeast: a comparison of high-density oligonucleotide and PCR-based microarray platforms. *Funct Integr Genomics* **7**, 335-45.
- Bott, C. M. Thorneycroft, S. G. & Marshall, C. J.** (1994). The sevenmaker gain-of-function mutation in p42 MAP kinase leads to enhanced signalling and reduced sensitivity to dual specificity phosphatase action. *FEBS Lett* **352**, 201-5.
- Breitkreutz, A. Boucher, L. & Tyers, M.** (2001). MAPK specificity in the yeast pheromone response independent of transcriptional activation. *Curr Biol* **11**, 1266-71.

- Brunner, D. Oellers, N. Szabad, J. Biggs, W. H., 3rd Zipursky, S. L. & Hafen, E.** (1994). A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* **76**, 875-88.
- Buschbeck, M. Eickhoff, J. Sommer, M. N. & Ullrich, A.** (2002). Phosphotyrosine-specific phosphatase PTP-SL regulates the ERK5 signaling pathway. *J Biol Chem* **277**, 29503-9.
- Butty, A. C. Pryciak, P. M. Huang, L. S. Herskowitz, I. & Peter, M.** (1998). The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science* **282**, 1511-6.
- Cabib, E. Blanco, N. Grau, C. Rodriguez-Pena, J. M. & Arroyo, J.** (2007). Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **63**, 921-35.
- Camps, M. Nichols, A. & Arkinstall, S.** (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J* **14**, 6-16.
- Cohen, P.T.W.** (2004). Overview of protein serine/threonine phosphatases in Topics in Current Genetics, J. Ariño, D.R. Alexander (Eds). Vol. 5, pp1-23.
- Collister, M. Didmon, M. P. MacIsaac, F. Stark, M. J. MacDonald, N. Q. & Keyse, S. M.** (2002). YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* **527**, 186-92.
- Company, M. Adler, C. & Errede, B.** (1988). Identification of a Ty1 regulatory sequence responsive to STE7 and STE12. *Mol Cell Biol* **8**, 2545-54.
- Cook, J. G. Bardwell, L. Kron, S. J. & Thorner, J.** (1996). Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**, 2831-48.
- Coulombe, P. & Meloche, S.** (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1376-87.
- Cowan, K. J. & Storey, K. B.** (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* **206**, 1107-15.
- Cullen, P. J. Sabbagh, W., Jr. Graham, E. Irick, M. M. van Olden, E. K. Neal, C. Delrow, J. Bardwell, L. & Sprague, G. F., Jr.** (2004). A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* **18**, 1695-708.
- Cullen, P. J. Schultz, J. Horecka, J. Stevenson, B. J. Jigami, Y. & Sprague, G. F., Jr.** (2000). Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**, 1005-18.
- Chen, P. Hutter, D. Yang, X. Gorospe, M. Davis, R. J. & Liu, Y.** (2001). Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically. *J Biol Chem* **276**, 29440-9.
- Chen, R. E. & Thorner, J.** (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1311-40.
- Chirivi, R. G. Dilaver, G. van de Vorstenbosch, R. Wanschers, B. Schepens, J. Croes, H. Fransen, J. & Hendriks, W.** (2004). Characterization of multiple transcripts and isoforms derived from the mouse protein tyrosine phosphatase gene Ptprr. *Genes Cells* **9**, 919-33.
- Choi, K. Y. Satterberg, B. Lyons, D. M. & Elion, E. A.** (1994). Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**, 499-512.
- Chou, S. Lane, S. & Liu, H.** (2006). Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**, 4794-805.
- Chu, Y. Solski, P. A. Khosravi-Far, R. Der, C. J. & Kelly, K.** (1996). The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem* **271**, 6497-501.
- Dard, N. & Peter, M.** (2006). Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *Bioessays* **28**, 146-56.
- Davenport, K. D. Williams, K. E. Ullmann, B. D. & Gustin, M. C.** (1999). Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentation/invasion pathway by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants. *Genetics* **153**, 1091-103.

- de Nadal, E. Alepuz, P. M. & Posas, F.** (2002). Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* **3**, 735-40.
- de Nobel, H. Ruiz, C. Martin, H. Morris, W. Brul, S. Molina, M. & Klis, F. M.** (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146** (Pt 9), 2121-32.
- Dickens, M. Rogers, J. S. Cavanagh, J. Raitano, A. Xia, Z. Halpern, J. R. Greenberg, M. E. Sawyers, C. L. & Davis, R. J.** (1997). A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* **277**, 693-6.
- Dickinson, J. R.** (2008). Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Folia Microbiol (Praha)* **53**, 3-14.
- Dickinson, R. J. & Keyse, S. M.** (2006). Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci* **119**, 4607-15.
- Dodou, E. & Treisman, R.** (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**, 1848-59.
- Dohlman, H. G. & Slessareva, J. E.** (2006). Pheromone signaling pathways in yeast. *Sci STKE* **2006**, cm6.
- Dohlman, H. G. & Thorner, J. W.** (2001). Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu Rev Biochem* **70**, 703-54.
- Doi, K. Gartner, A. Ammerer, G. Errede, B. Shinkawa, H. Sugimoto, K. & Matsumoto, K.** (1994). MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *Embo J* **13**, 61-70.
- Dowd, S. Sneddon, A. A. & Keyse, S. M.** (1998). Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *J Cell Sci* **111** (Pt 22), 3389-99.
- Du, Y. Walker, L. Novick, P. & Ferro-Novick, S.** (2006). Ptc1p regulates cortical ER inheritance via Slt2p. *Embo J* **25**, 4413-22.
- Elion, E. A.** (2001). The Ste5p scaffold. *J Cell Sci* **114**, 3967-78.
- Elion, E. A. Brill, J. A. & Fink, G. R.** (1991). FUS3 represses CLN1 and CLN2 and in concert with KSS1 promotes signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9392-6.
- Enslen, H. & Davis, R. J.** (2001). Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biol Cell* **93**, 5-14.
- Erdman, S. Lin, L. Malczynski, M. & Snyder, M.** (1998). Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J Cell Biol* **140**, 461-83.
- Errede, B. & Ammerer, G.** (1989). STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes. *Genes Dev* **3**, 1349-61.
- Fant, D. A. Jacobs, D. Glossip, D. & Kornfeld, K.** (2001). Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues. *J Biol Chem* **276**, 27256-65.
- Flandez, M.** (2004). Una proteína fosfatasa dual que regula la MAP quinasa Slt2 de la ruta de integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Flandez, M. Cosano, I. C. Nombela, C. Martin, H. & Molina, M.** (2004). Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **279**, 11027-34.
- Flessel, M. C. Brake, A. J. & Thorner, J.** (1989). The MF alpha 1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: genetic mapping and mutational analysis of promoter elements. *Genetics* **121**, 223-36.
- Fox, G. C. Shafiq, M. Briggs, D. C. Knowles, P. P. Collister, M. Didmon, M. J. Makrantonis, V. Dickinson, R. J. Hanrahan, S. Totty, N. Stark, M. J. Keyse, S. M. & McDonald, N. Q.** (2007). Redox-mediated substrate recognition by Sdp1 defines a new group of tyrosine phosphatases. *Nature* **447**, 487-92.
- Friedman, A. & Perrimon, N.** (2006). A functional RNAi screen for regulators of receptor tyrosine kinase and ERK signalling. *Nature* **444**, 230-4.
- Gancedo, J. M.** (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 107-23.

- Garcia, R. Bermejo, C. Grau, C. Perez, R. Rodriguez-Pena, J. M. Francois, J. Nombela, C. & Arroyo, J.** (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**, 15183-95.
- Garcia, R. Rodriguez-Pena, J. M. Bermejo, C. Nombela, C. & Arroyo, J.** (2009). The HOG and CWI pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *S. cerevisiae*. *J Biol Chem*.
- Garrenton, L. S. Braunwarth, A. Irrniger, S. Hurt, E. Kunzler, M. & Thorner, J.** (2009). Nucleus-specific and cell cycle-regulated degradation of mitogen-activated protein kinase scaffold protein Ste5 contributes to the control of signaling competence. *Mol Cell Biol* **29**, 582-601.
- Gietz, R. D. & Sugino, A.** (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527-34.
- Gonzalez, A. Ruiz, A. Serrano, R. Arino, J. & Casamayor, A.** (2006). Transcriptional profiling of the protein phosphatase 2C family in yeast provides insights into the unique functional roles of Ptc1. *J Biol Chem* **281**, 35057-69.
- Good, M. Tang, G. Singleton, J. Remenyi, A. & Lim, W. A.** (2009). The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation. *Cell* **136**, 1085-97.
- Grewal, S. Molina, D. M. & Bardwell, L.** (2006). Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-docking sites in MAPK kinases function as tethers that are crucial for MAPK regulation in vivo. *Cell Signal* **18**, 123-34.
- Groom, L. A. Sneddon, A. A. Alessi, D. R. Dowd, S. & Keyse, S. M.** (1996). Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *Embo J* **15**, 3621-32.
- Guan, K. L. Broyles, S. S. & Dixon, J. E.** (1991). A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* **350**, 359-62.
- Guan, K. L. & Dixon, J. E.** (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* **192**, 262-7.
- Hahn, J. S. & Thiele, D. J.** (2002). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J Biol Chem* **277**, 21278-84.
- Hanada, M. Kobayashi, T. Ohnishi, M. Ikeda, S. Wang, H. Katsura, K. Yanagawa, Y. Hiraga, A. Kanamaru, R. & Tamura, S.** (1998). Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. *FEBS Lett* **437**, 172-6.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Hao, N. Zeng, Y. Elston, T. C. & Dohlman, H. G.** (2008). Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. *J Biol Chem* **283**, 33798-802.
- Harrison, J. C. Zyla, T. R. Bardes, E. S. & Lew, D. J.** (2004). Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway. *J Biol Chem* **279**, 2616-22.
- Hawle, P. Horst, D. Bebelman, J. P. Yang, X. X. Siderius, M. & van der Vies, S. M.** (2007). Cdc37p is required for stress-induced high-osmolarity glycerol and protein kinase C mitogen-activated protein kinase pathway functionality by interaction with Hog1p and Slt2p (Mpk1p). *Eukaryot Cell* **6**, 521-32.
- Ho, D. T. Bardwell, A. J. Grewal, S. Iverson, C. & Bardwell, L.** (2006). Interacting JNK-docking sites in MKK7 promote binding and activation of JNK mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **281**, 13169-79.
- Hohmann, S.** (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 300-72.
- Hohmann, S. Krantz, M. & Nordlander, B.** (2007). Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol* **428**, 29-45.
- Hu, M. C. Wang, Y. P. Mikhail, A. Qiu, W. R. & Tan, T. H.** (1999). Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. *J Biol Chem* **274**, 7095-102.

- Huang, K. N. & Symington, L. S.** (1995). Suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* *pkc1* mutation identify alleles of the phosphatase gene *PTC1* and of a novel gene encoding a putative basic leucine zipper protein. *Genetics* **141**, 1275-85.
- Imamura, H. Tanaka, K. Hihara, T. Umikawa, M. Kamei, T. Takahashi, K. Sasaki, T. & Takai, Y.** (1997). Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **16**, 2745-55.
- Inagaki, M. Schmelzle, T. Yamaguchi, K. Irie, K. Hall, M. N. & Matsumoto, K.** (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol Cell Biol* **19**, 8344-52.
- Irie, K. Takase, M. Lee, K. S. Levin, D. E. Araki, H. Matsumoto, K. & Oshima, Y.** (1993). MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol Cell Biol* **13**, 3076-83.
- Jacoby, T. Flanagan, H. Faykin, A. Seto, A. G. Mattison, C. & Ota, I.** (1997). Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J Biol Chem* **272**, 17749-55.
- James, P. Halladay, J. & Craig, E. A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-36.
- Janssens, V. & Goris, J.** (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353**, 417-39.
- Jeong, D. G. Yoon, T. S. Kim, J. H. Shim, M. Y. Jung, S. K. Son, J. H. Ryu, S. E. & Kim, S. J.** (2006). Crystal structure of the catalytic domain of human MAP kinase phosphatase 5: structural insight into constitutively active phosphatase. *J Mol Biol* **360**, 946-55.
- Jimenez-Sanchez, M. Cid, V. J. & Molina, M.** (2007). Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slf2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **282**, 31174-85.
- Jung, U. S. & Levin, D. E.** (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* **34**, 1049-57.
- Jung, U. S. Sobering, A. K. Romeo, M. J. & Levin, D. E.** (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol* **46**, 781-9.
- Kallunki, T. Su, B. Tsigelny, I. Sluss, H. K. Derijard, B. Moore, G. Davis, R. & Karin, M.** (1994). JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev* **8**, 2996-3007.
- Keyse, S. M.** (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 186-92.
- Keyse, S. M.** (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 253-61.
- Kim, K. Y. Cosano, I. C. Levin, D. E. Molina, M. & Martin, H.** (2007). Dissecting the transcriptional activation function of the cell wall integrity MAP kinase. *Yeast* **24**, 335-42.
- Kim, K. Y. Truman, A. W. & Levin, D. E.** (2008). Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol* **28**, 2579-89.
- Kins, S. Kurosinski, P. Nitsch, R. M. & Gotz, J.** (2003). Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am J Pathol* **163**, 833-43.
- Kondoh, K. & Nishida, E.** (2007). Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1227-37.
- Krisak, L. Strich, R. Winters, R. S. Hall, J. P. Mallory, M. J. Kreitzer, D. Tuan, R. S. & Winter, E.** (1994). SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **8**, 2151-61.
- Krishna, M. & Narang, H.** (2008). The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3525-44.
- Kuchin, S. Vyas, V. K. & Carlson, M.** (2003). Role of the yeast Snf1 protein kinase in invasive growth. *Biochem Soc Trans* **31**, 175-7.

- Kuranda, K. Leberre, V. Sokol, S. Palamarczyk, G. & Francois, J.** (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**, 1147-66.
- Kusari, A. B. Molina, D. M. Sabbagh, W., Jr. Lau, C. S. & Bardwell, L.** (2004). A conserved protein interaction network involving the yeast MAP kinases Fus3 and Kss1. *J Cell Biol* **164**, 267-77.
- Lagorce, A. Hauser, N. C. Labourdette, D. Rodriguez, C. Martin-Yken, H. Arroyo, J. Hoheisel, J. D. & Francois, J.** (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**, 20345-57.
- Leberer, E. Wu, C. Leeuw, T. Fourest-Lieuvin, A. Segall, J. E. & Thomas, D. Y.** (1997). Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *Embo J* **16**, 83-97.
- Lee, B. N. & Elion, E. A.** (1999). The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12679-84.
- Lee, K. S. Irie, K. Gotoh, Y. Watanabe, Y. Araki, H. Nishida, E. Matsumoto, K. & Levin, D. E.** (1993). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol* **13**, 3067-75.
- Lefrancois, P. Euskirchen, G. M. Auerbach, R. K. Rozowsky, J. Gibson, T. Yellman, C. M. Gerstein, M. & Snyder, M.** (2009). Efficient yeast ChIP-Seq using multiplex short-read DNA sequencing. *BMC Genomics* **10**, 37.
- Levin-Salomon, V. Maayan, I. Avrahami-Moyal, L. Marbach, I. Livnah, O. & Engelberg, D.** (2009). When expressed in yeast, mammalian mitogen-activated protein kinases lose proper regulation and become spontaneously phosphorylated. *Biochem J* **417**, 331-40.
- Levin, D. E.** (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 262-91.
- Levin, D. E. Bowers, B. Chen, C. Y. Kamada, Y. & Watanabe, M.** (1994). Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* **40**, 229-39.
- Levin, D. E. Fields, F. O. Kunisawa, R. Bishop, J. M. & Thorner, J.** (1990). A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**, 213-24.
- Liu, H. Styles, C. A. & Fink, G. R.** (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**, 1741-4.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8.
- Lo, W. S. & Dranginis, A. M.** (1996). FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* **178**, 7144-51.
- Longin, S. Zwaenepoel, K. Louis, J. V. Dilworth, S. Goris, J. & Janssens, V.** (2007). Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit. *J Biol Chem* **282**, 26971-80.
- Lorenz, K. Schmitt, J. P. Schmitteckert, E. M. & Lohse, M. J.** (2009). A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* **15**, 75-83.
- Lorenz, M. C. Pan, X. Harashima, T. Cardenas, M. E. Xue, Y. Hirsch, J. P. & Heitman, J.** (2000). The G protein-coupled receptor gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**, 609-22.
- Lu, G. & Wang, Y.** (2008). Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms: new tales from an old family. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**, 107-12.
- Ma, D. Cook, J. G. & Thorner, J.** (1995). Phosphorylation and localization of Kss1, a MAP kinase of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Mol Biol Cell* **6**, 889-909.
- Madden, K. Sheu, Y. J. Baetz, K. Andrews, B. & Snyder, M.** (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* **275**, 1781-4.
- Madhani, H. D. & Fink, G. R.** (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**, 1314-7.
- Madhani, H. D. Galitski, T. Lander, E. S. & Fink, G. R.** (1999). Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12530-5.

- Maeda, T. Wurgler-Murphy, S. M. & Saito, H.** (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242-5.
- Mapes, J. & Ota, I. M.** (2004). Nbp2 targets the Ptc1-type 2C Ser/Thr phosphatase to the HOG MAPK pathway. *Embo J* **23**, 302-11.
- Marshall, C. J.** (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-85.
- Martin-Yken, H. Dagkessamanskaia, A. Basmaji, F. Lagorce, A. & Francois, J.** (2003). The interaction of Slr2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **49**, 23-35.
- Martin-Yken, H. Dagkessamanskaia, A. Talibi, D. & Francois, J.** (2002). KNR4 is a member of the PKC1 signalling pathway and genetically interacts with BCK2, a gene involved in cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **41**, 323-32.
- Martin, H. Flandez, M. Nombela, C. & Molina, M.** (2005). Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol* **58**, 6-16.
- Martin, H. Rodriguez-Pachon, J. M. Ruiz, C. Nombela, C. & Molina, M.** (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 1511-9.
- Mas, G. de Nadal, E. Dechant, R. de la Concepcion, M. L. Logie, C. Jimeno-Gonzalez, S. Chavez, S. Ammerer, G. & Posas, F.** (2009). Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *Embo J* **28**, 326-36.
- Masuda, K. Shima, H. Katagiri, C. & Kikuchi, K.** (2003). Activation of ERK induces phosphorylation of MAPK phosphatase-7, a JNK specific phosphatase, at Ser-446. *J Biol Chem* **278**, 32448-56.
- Mattison, C. P. & Ota, I. M.** (2000). Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev* **14**, 1229-35.
- Mattison, C. P. Spencer, S. S. Kresge, K. A. Lee, J. & Ota, I. M.** (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol Cell Biol* **19**, 7651-60.
- Mayor, F., Jr. Jurado-Pueyo, M. Campos, P. M. & Murga, C.** (2007). Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route. *Cell Cycle* **6**, 528-33.
- Millson, S. H. Truman, A. W. King, V. Prodromou, C. Pearl, L. H. & Piper, P. W.** (2005). A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slr2p (Mpk1p). *Eukaryot Cell* **4**, 849-60.
- Mitchell, D. A. Marshall, T. K. & Deschenes, R. J.** (1993). Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* **9**, 715-22.
- Morrison, D. K. & Davis, R. J.** (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 91-118.
- Muda, M. Theodosiou, A. Rodrigues, N. Boschert, U. Camps, M. Gillieron, C. Davies, K. Ashworth, A. & Arkinstall, S.** (1996). The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **271**, 27205-8.
- Murakami, Y. Tatebayashi, K. & Saito, H.** (2008). Two adjacent docking sites in the yeast Hog1 mitogen-activated protein (MAP) kinase differentially interact with the Pbs2 MAP kinase kinase and the Ptp2 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* **28**, 2481-94.
- Mustelin, T. Tautz, L. & Page, R.** (2005). Structure of the hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP) catalytic domain: structure of a KIM phosphatase with phosphate bound at the active site. *J Mol Biol* **354**, 150-63.
- Nichols, A. Camps, M. Gillieron, C. Chabert, C. Brunet, A. Wilsbacher, J. Cobb, M. Pouyssegur, J. Shaw, J. P. & Arkinstall, S.** (2000). Substrate recognition domains within extracellular signal-regulated kinase mediate binding and catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3. *J Biol Chem* **275**, 24613-21.
- Owens, D. M. & Keyse, S. M.** (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**, 3203-13.

- Ozaki, K. Tanaka, K. Imamura, H. Hihara, T. Kameyama, T. Nonaka, H. Hirano, H. Matsuura, Y. & Takai, Y.** (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **15**, 2196-207.
- Palecek, S. P. Parikh, A. S. & Kron, S. J.** (2002). Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology* **148**, 893-907.
- Paravicini, G. & Friedli, L.** (1996). Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol Gen Genet* **251**, 682-91.
- Patterson, K. I. Brummer, T. O'Brien, P. M. & Daly, R. J.** (2009). Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J* **418**, 475-89.
- Philip, B. & Levin, D. E.** (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* **21**, 271-80.
- Pimienta, G. & Pascual, J.** (2007). Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle* **6**, 2628-32.
- Pokholok, D. K. Zeitlinger, J. Hannett, N. M. Reynolds, D. B. & Young, R. A.** (2006). Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* **313**, 533-6.
- Popolo, L. Gilardelli, D. Bonfante, P. & Vai, M.** (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *gpp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**, 463-9.
- Posas, F. & Saito, H.** (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**, 1702-5.
- Posas, F. Takekawa, M. & Saito, H.** (1998). Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **1**, 175-82.
- Prickett, T. D. & Brautigan, D. L.** (2007). Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3. *Mol Cell Biol* **27**, 4217-27.
- Pulido, R. Zuniga, A. & Ullrich, A.** (1998). PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *Embo J* **17**, 7337-50.
- Qi, M. & Elion, E. A.** (2005). MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**, 3569-72.
- Rajavel, M. Philip, B. Buehrer, B. M. Errede, B. & Levin, D. E.** (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 3969-76.
- Raman, M. Chen, W. & Cobb, M. H.** (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100-12.
- Ramezani-Rad, M.** (2003). The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast. *Curr Genet* **43**, 161-70.
- Reiser, V. Raitt, D. C. & Saito, H.** (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* **161**, 1035-40.
- Remenyi, A. Good, M. C. Bhattacharyya, R. P. & Lim, W. A.** (2005). The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Mol Cell* **20**, 951-62.
- Rep, M. Krantz, M. Thevelein, J. M. & Hohmann, S.** (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* **275**, 8290-300.
- Roberts, C. J. Nelson, B. Marton, M. J. Stoughton, R. Meyer, M. R. Bennett, H. A. He, Y. D. Dai, H. Walker, W. L. Hughes, T. R. Tyers, M. Boone, C. & Friend, S. H.** (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**, 873-80.
- Roberts, R. L. & Fink, G. R.** (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**, 2974-85.
- Rodriguez-Pachon, J. M. Martin, H. North, G. Rotger, R. Nombela, C. & Molina, M.** (2002). A novel connection between the yeast Cdc42 GTPase and the Sit2-mediated cell integrity pathway identified through the effect of secreted *Salmonella* GTPase modulators. *J Biol Chem* **277**, 27094-102.

- Rodriguez-Pena, J. M. Cid, V. J. Arroyo, J. & Nombela, C.** (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol Cell Biol* **20**, 3245-55.
- Roncero, C. & Duran, A.** (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**, 1180-5.
- Roumanie, O. Wu, H. Molk, J. N. Rossi, G. Bloom, K. & Brennwald, P.** (2005). Rho GTPase regulation of exocytosis in yeast is independent of GTP hydrolysis and polarization of the exocyst complex. *J Cell Biol* **170**, 583-94.
- Roux, P. P. & Blenis, J.** (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-44.
- Ruiz, C. Escribano, V. Morgado, E. Molina, M. & Mazon, M. J.** (2003). Cell-type-dependent repression of yeast α -specific genes requires Itc1p, a subunit of the Isw2p-Itc1p chromatin remodelling complex. *Microbiology* **149**, 341-51.
- Sabbagh, W., Jr. Flatauer, L. J. Bardwell, A. J. & Bardwell, L.** (2001). Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol Cell* **8**, 683-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.,** (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual.
- Saxena, M. & Mustelin, T.** (2000). Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol* **12**, 387-96.
- Schmelzle, T. & Hall, M. N.** (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**, 253-62.
- Seyfried, J. Wang, X. Kharebava, G. & Tournier, C.** (2005). A novel mitogen-activated protein kinase docking site in the N terminus of MEK5 α organizes the components of the extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **25**, 9820-8.
- Sharrocks, A. D. Yang, S. H. & Galanis, A.** (2000). Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem Sci* **25**, 448-53.
- Sikorski, R. S. & Hieter, P.** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Slack, D. N. Seternes, O. M. Gabrielsen, M. & Keyse, S. M.** (2001). Distinct binding determinants for ERK2/p38 α and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* **276**, 16491-500.
- Slessareva, J. E. Routt, S. M. Temple, B. Bankaitis, V. A. & Dohlman, H. G.** (2006). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein α subunit at the endosome. *Cell* **126**, 191-203.
- Soler, M. Plovins, A. Martin, H. Molina, M. & Nombela, C.** (1995). Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and in vivo interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol Microbiol* **17**, 833-42.
- Sotelo, J. & Rodriguez-Gabriel, M. A.** (2006). Mitogen-activated protein kinase Hog1 is essential for the response to arsenite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **5**, 1826-30.
- Staleva, L. Hall, A. & Orlow, S. J.** (2004). Oxidative stress activates FUS1 and RLM1 transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent Manner. *Mol Biol Cell* **15**, 5574-82.
- Stewart, A. E. Dowd, S. Keyse, S. M. & McDonald, N. Q.** (1999). Crystal structure of the MAPK phosphatase Pyst1 catalytic domain and implications for regulated activation. *Nat Struct Biol* **6**, 174-81.
- Straede, A. Corran, A. Bundy, J. & Heinisch, J. J.** (2007). The effect of tea tree oil and antifungal agents on a reporter for yeast cell integrity signalling. *Yeast* **24**, 321-34.
- Tabernero, L. Aricescu, A. R. Jones, E. Y. & Szedlacsek, S. E.** (2008). Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. *Febs J* **275**, 867-82.
- Tanoue, T. Adachi, M. Moriguchi, T. & Nishida, E.** (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* **2**, 110-6.
- Tanoue, T. Maeda, R. Adachi, M. & Nishida, E.** (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *Embo J* **20**, 466-79.
- Tanoue, T. & Nishida, E.** (2003). Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* **15**, 455-62.

- Tanoue, T. Yamamoto, T. & Nishida, E.** (2002). Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *J Biol Chem* **277**, 22942-9.
- Tatebayashi, K. Tanaka, K. Yang, H. Y. Yamamoto, K. Matsushita, Y. Tomida, T. Imai, M. & Saito, H.** (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *Embo J* **26**, 3521-33.
- Teixeira, M. C. Monteiro, P. Jain, P. Tenreiro, S. Fernandes, A. R. Mira, N. P. Alenquer, M. Freitas, A. T. Oliveira, A. L. & Sa-Correia, I.** (2006). The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **34**, D446-51.
- Terrance, K. & Lipke, P. N.** (1987). Pheromone induction of agglutination in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J Bacteriol* **169**, 4811-5.
- Theodosiou, A. & Ashworth, A.** (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3009.
- Tonks, N. K. & Neel, B. G.** (2001). Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 182-95.
- Trueheart, J. Boeke, J. D. & Fink, G. R.** (1987). Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol Cell Biol* **7**, 2316-28.
- Uetz, P. Giot, L. Cagney, G. Mansfield, T. A. Judson, R. S. Knight, J. R. Lockshon, D. Narayan, V. Srinivasan, M. Pochart, P. Qureshi-Emili, A. Li, Y. Godwin, B. Conover, D. Kalbfleisch, T. Vijayadamodar, G. Yang, M. Johnston, M. Fields, S. & Rothberg, J. M.** (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-7.
- Vahebi, S. Ota, A. Li, M. Warren, C. M. de Tombe, P. P. Wang, Y. & Solaro, R. J.** (2007). p38-MAPK induced dephosphorylation of alpha-tropomyosin is associated with depression of myocardial sarcomeric tension and ATPase activity. *Circ Res* **100**, 408-15.
- van Drogen, F. & Peter, M.** (2002). Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol* **12**, 1698-703.
- Warmka, J. Hanneman, J. Lee, J. Amin, D. & Ota, I.** (2001). Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* **21**, 51-60.
- Warringer, J. Ericson, E. Fernandez, L. Nerman, O. & Blomberg, A.** (2003). High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15724-9.
- Watanabe, Y. Irie, K. & Matsumoto, K.** (1995). Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **15**, 5740-9.
- Watanabe, Y. Takaesu, G. Hagiwara, M. Irie, K. & Matsumoto, K.** (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**, 2615-23.
- Westfall, P. J. Patterson, J. C. Chen, R. E. & Thorner, J.** (2008). Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12212-7.
- Widmann, C. Gibson, S. Jarpe, M. B. & Johnson, G. L.** (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**, 143-80.
- Wilson-Grady, J. T. Villen, J. & Gygi, S. P.** (2008). Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J Proteome Res* **7**, 1088-97.
- Winkler, A. Arkind, C. Mattison, C. P. Burkholder, A. Knoche, K. & Ota, I.** (2002). Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell* **1**, 163-73.
- Wu, C. Jansen, G. Zhang, J. Thomas, D. Y. & Whiteway, M.** (2006). Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev* **20**, 734-46.
- Wu, G. S.** (2007). Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 579-85.
- Wurgler-Murphy, S. M. Maeda, T. Witten, E. A. & Saito, H.** (1997). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* **17**, 1289-97.

Young, C. Mapes, J. Hanneman, J. Al-Zarban, S. & Ota, I. (2002). Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryot Cell* **1**, 1032-40.

Zeitlinger, J. Simon, I. Harbison, C. T. Hannett, N. M. Volkert, T. L. Fink, G. R. & Young, R. A. (2003). Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* **113**, 395-404.

Zhan, X. L. Deschenes, R. J. & Guan, K. L. (1997). Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**, 1690-702.

Zhan, X. L. & Guan, K. L. (1999). A specific protein-protein interaction accounts for the in vivo substrate selectivity of Ptp3 towards the Fus3 MAP kinase. *Genes Dev* **13**, 2811-27.

Zhang, J. Zhou, B. Zheng, C. F. & Zhang, Z. Y. (2003). A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J Biol Chem* **278**, 29901-12.

Zu, T. Verna, J. & Ballester, R. (2001). Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **266**, 142-55.

Zuniga, A. Torres, J. Ubeda, J. & Pulido, R. (1999). Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *J Biol Chem* **274**, 21900-7.